

VISIT...

LANZAROTE
Caliente.COM

ХИМИЯ

биологически активных природных соединений





ХИМИЯ

биологически активных природных соединений

углевод-белковые
комплексы,

хромопротеиды,

липопротеиды,

липиды,

обмен веществ

МОСКВА
ИЗДАТЕЛЬСТВО „ХИМИЯ“ 1976

ХИМИЯ

биологически активных природных соединений

ПОД РЕДАКЦИЕЙ

Н. А. ПРЕОБРАЖЕНСКОГО

и Р. П. ЕВСТИГНЕЕВОЙ

*Допущено Министерством высшего и среднего специального
образования СССР в качестве учебного пособия для студентов
химических и химико-технологических специальностей вузов*

МОСКВА
ИЗДАТЕЛЬСТВО „ХИМИЯ“ 1976

Химия биологически активных природных соединений (углевод-белковые комплексы, хромопротеиды, липиды, липопротеиды, обмен веществ). Под ред. Н. А. Преображенского и Р. П. Евстигнеевой. М., «Химия», 1976.

Книга представляет собой вторую часть фундаментального учебного пособия, в основу которого положен курс лекций по химии биологически активных природных соединений, читаемый в Московском ордена Трудового Красного Знамени институте тонкой химической технологии им. М. В. Ломоносова на кафедре химии и технологии тонких органических соединений. В первой книге, выпущенной в 1970 г., была изложена химия белков, ферментов и нуклеиновых кислот, а также приведены данные по биохимическим функциям и превращениям этих веществ в организме.

В настоящей книге рассматриваются три класса сложных белков: углевод-белковые комплексы, хромопротеиды и липопротеиды. Изложены важнейшие аспекты химии углеводов, порфиринов и липидов, необходимые для понимания структуры и функции сложных белков. Книга включает также краткие сведения по обмену веществ, которые отражают роль рассмотренных соединений в общем метаболизме веществ в клетке. Освещены некоторые моменты биоэнергетики и регуляции обмена веществ.

Книга рассчитана на студентов старших курсов химических и биохимических факультетов вузов, аспирантов и научных сотрудников, работающих в области биоорганической химии. Она представляет интерес для широкого круга химиков-органиков, биохимиков и биологов.

456 стр., 20 табл., 29 рис., список литературы 570 ссылок.

Авторы: *Евстигнеева Р. П., Серебренникова Г. А., Звонкова Е. Н., Филиппович Е. И., Митрофанова Т. К., Мягова Г. И., Скляр Ю. Е.*

Рецензенты: Кафедра химии природных соединений МГУ им. М. В. Ломоносова (зав. кафедрой член-корреспондент АН СССР М. А. Прокофьев), член-корреспондент АН СССР Н. К. Кочетков, член-корреспондент АН СССР Л. Д. Бергельсон, член-корреспондент АН СССР В. П. Скулачев, профессор В. М. Степанов.

X $\frac{20504-158}{050(01)-76}$ 48-75

© Издательство «Химия», 1976 г.

СОДЕРЖАНИЕ

Предисловие	8
I. УГЛЕВОД-БЕЛКОВЫЕ КОМПЛЕКСЫ	9
Общие сведения	9
Углеводы как структурные компоненты углевод-белковых комплексов	10
Моносахариды	10
Олигосахариды	47
Полисахариды	59
Биосинтез и катаболизм углеводов	64
Белковые составляющие углевод-белковых комплексов	72
Углевод-белковые комплексы	72
Методы выделения углевод-белковых комплексов	74
Определение размера и формы молекул углевод-белковых соединений	75
Установление структуры углеводных составляющих углевод-белковых комплексов	76
Типы связей между углеводами и белками в углевод-белковых комплексах	84
Отдельные представители углевод-белковых комплексов	85
<i>Литература</i>	<i>98</i>
II. ХРОМОПРОТЕИДЫ	100
Порфирины	101
Изомерия в ряду порфиринов	101
Восстановленные формы порфиринов	102
Физико-химические свойства порфиринов	103
Методы выделения и разделения порфиринов	111
Синтез порфиринов	112
Гемоглобин и миоглобин	125
Гемоглобин	125
Миоглобин	139
Биосинтез и катаболизм гемоглобина	142
Цитохромы	150

Цитохромы группы <i>A</i>	152
Цитохромы группы <i>B</i>	155
Цитохромы группы <i>C</i>	158
Цитохромы группы <i>D</i>	165
Хлорофиллы	165
Хлорофилл <i>a</i>	167
Биосинтез хлорофиллов	179
Ретинилиденпротеиды	180
Литература	183

III. ЛИПИДЫ И ЛИПОПРОТЕИДЫ 185

Классификация липидов	185
Выделение липидов	186
Фракционирование нейтральных липидов	187
Фракционирование фосфолипидов	188
Структурные компоненты липидов	191
Высшие жирные кислоты	191
Высшие жирные спирты и альдегиды	215
Полиолы	216
Углеводы	218
Аминоспирты и аминокислоты	218
Неорганические кислоты	219
Стереохимия и номенклатура липидов	219
Нейтральные липиды	225
Природные глицериды	225
Нейтральные липиды с простой эфирной связью	249
Нейтральные диольные липиды	257
Эфиры холестерина	258
Гликолипиды	259
Фосфолипиды	264
Типы природных фосфолипидов	264
Свойства фосфолипидов	266
Методы установления структуры фосфолипидов	270
Общие принципы синтеза фосфолипидов	273
Отдельные классы фосфолипидов	279
Сфинголипиды	324
Сфингозиновые основания	324
Природные сфинголипиды	338
Биосинтез и катаболизм липидов	346
Биосинтез высших жирных кислот	346
Катаболизм жирных кислот	351
Биосинтез и катаболизм нейтральных липидов	352
Биосинтез и катаболизм фосфолипидов	356

Биосинтез и катаболизм липидов с прочной эфирной связью	362
Биосинтез и катаболизм сфинголипидов	364
Липопротеиды и их биологическая роль	368
Липопротеиды плазмы	369
Мембранные структуры	373
Протеолипиды	379
Биологическое значение липидов	380
<i>Литература</i>	382
 IV. ОБМЕН ВЕЩЕСТВ	 391
Общие сведения	391
Пищеварение и резорбция	393
Локализация процессов промежуточного обмена в клетках	397
Цикл лимонной кислоты	399
Дыхательная цепь и окислительное фосфорилирование	402
Некоторые вопросы молекулярной биоэнергетики	406
Принципы химической термодинамики в приложении к биологическим системам	409
Высокоэнергетические соединения	413
Энергетические механизмы живой клетки	418
Использование энергии биологическими системами	429
Регуляция метаболизма в клетке	432
<i>Литература</i>	439
Предметный указатель	441

ПРЕДИСЛОВИЕ

Современный этап развития естественных наук характеризуется взаимопроникновением их друг в друга, обменом идей и методов исследования. Особенно тесные контакты наблюдаются у биологии и химии. Изучение биологических процессов на молекулярном уровне с широким привлечением физико-химических методов исследования способствовало резкому прогрессу в познании основ жизнедеятельности и ознаменовалось крупнейшими открытиями. В настоящее время исследователи подошли к решению проблемы, связанной с выяснением сущности таких процессов, как дыхание, зрение, мышление и т. д. Важнейшая роль в этих процессах принадлежит сложным белкам, содержащим помимо белка соединения других классов биологически активных веществ.

В первой части книги, вышедшей в 1970 г., изложены сведения по химии и биологической роли белков, ферментов, нуклеиновых кислот и нуклеопротеидов. Во второй части рассматриваются сложные белки, содержащие углеводы, порфирины и липиды. Приведены краткие сведения по обмену веществ, что позволило показать участие рассмотренных соединений в общем метаболизме веществ в клетке, затронуты также некоторые вопросы биоэнергетики и регуляции обмена веществ.

Мы надеемся, что настоящее учебное пособие даст необходимую основу для более углубленного изучения отдельных классов сложных белков.

Работа над книгой была начата по инициативе и при непосредственном участии профессора Николая Алексеевича Преображенского, а закончена после его смерти.

Коллектив авторов приносит глубокую благодарность за обсуждение и ценные советы при подготовке рукописи чл.-корр. АН СССР М. А. Прокофьеву, чл.-корр. АН СССР Н. К. Кочеткову, чл.-корр. АН СССР Л. Д. Бергельсону, чл.-корр. АН СССР В. П. Скулачеву, проф. В. М. Степанову, докт. биол. наук А. А. Ясайтису, канд. хим. наук Б. А. Дмитриеву, а также канд. хим. наук Н. Б. Тарусовой и канд. хим. наук О. Н. Толкачеву за участие в работе на отдельных этапах подготовки рукописи.

I. УГЛЕВОД-БЕЛКОВЫЕ КОМПЛЕКСЫ

ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ

Среди структурных компонентов клетки широко представлены биополимеры, содержащие в своем составе углеводы и белки. Они выделяются в особый класс сложных белков, специфика свойств которых определяется наличием углеводной составляющей. Для них характерно образование растворов высокой вязкости в физиологических буферных смесях, причем некоторые соединения даже при низкой концентрации дают плотные гели, обладающие большим сродством к белкам и липидам.

Углевод-белковые комплексы достаточно разнообразны по структуре и функциям. Они встречаются во всех тканях организма человека и животных, в растениях, водорослях и бактериях. В составе стенок клеток они образуют биологически активные поверхности, которые соединяют клетки друг с другом. Эти вещества образуют жидкую фазу соединительной ткани, обеспечивают работу транспортной и защитной систем организма. Углеводсодержащим полимерам отведена существенная роль в энергетическом балансе клетки.

Первые попытки выделения соединений данного класса из пшеничных зерен описаны Берцеллиусом в 1822 г. Вполне естественно, что в то время не могла идти речь о выделении индивидуальных веществ. Значительное число исследований относится к изучению веществ слизистых выделений животных и человека, которые были названы муцинами (от *mucus* — слизь) и, как это было показано значительно позднее, представляли собой углевод-белковые комплексы. Аналогичные соединения выделены из соединительной ткани, в частности из хряща, и описаны как мукопротеины. К этому периоду исследований относится и надежная идентификация в их составе углеводных остатков. Далее были открыты группоспецифические вещества крови: вместе с ними прочно вошел термин гликопротеины. Вскоре началось химическое изучение этих соединений.

Выделение индивидуальных углевод-белковых комплексов сопряжено с большими трудностями. Этим объясняется тот факт, что даже для наиболее хорошо изученных представителей данного класса соединений многие детали их структуры полностью не выяснены, а также отсутствие четкой классификации углевод-белковых комплексов.

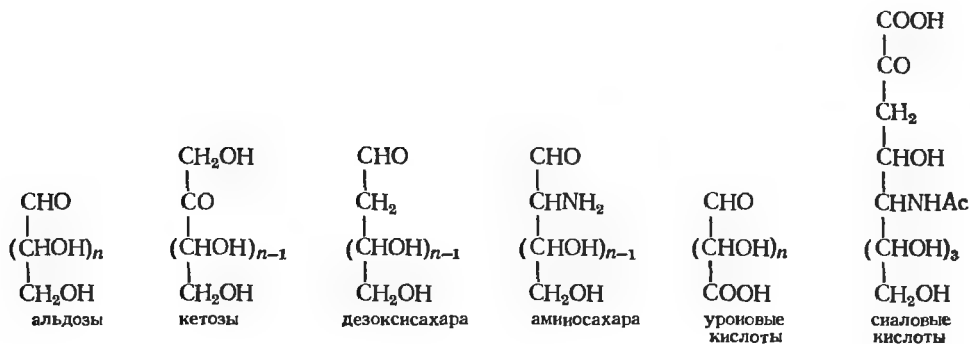
В структуре любого углевод-белкового комплекса представлены две части: углеводная и белковая. Удельный вес каждой из них зависит от характера углевод-белкового комплекса. Так, в полисахарид-белковых комплексах больший удельный вес приходится на углеводную часть и соединение проявляет свойства, присущие углеводам. Напротив, в гликопротеинах выше вклад белковой части и для них характерны реакции, свойственные белкам. Химическое строение как углеводных, так и белковых компонентов комплексов и способы соединения компонентов в молекуле комплекса весьма разнообразны.

УГЛЕВОДЫ КАК СТРУКТУРНЫЕ КОМПОНЕНТЫ УГЛЕВОД-БЕЛКОВЫХ КОМПЛЕКСОВ

Углеводы представляют собой полиоксикарбонильные соединения. В соответствии с классификацией углеводов различают моносахариды, олигосахариды и полисахариды.

Моносахариды [1—5] обычно содержат от 3 до 9 атомов углерода, причем наиболее распространены пентозы и гексозы. По характеру карбонильной функции они делятся на альдозы и кетозы.

К моносахаридам относятся также соединения, возникающие в результате замены одной из гидроксильных групп на атом водорода (дезоксисахара), аминогруппу (аминосахара), соединения, содержащие карбоксильную группу (уроновые кислоты), и полифункциональные соединения (сиаловые кислоты):



Олигосахариды включают от 2 до 10 моносахаридных остатков, соединенных гликозидными связями. *Полисахариды* являются полимерными соединениями, построенными из определенным образом связанных моносахаридных остатков. Различают гомополисахариды, состоящие из однородных мономеров, и гетерополисахариды, содержащие различные мономеры.

Углеводные компоненты углевод-белковых комплексов, как правило, представлены олиго- или полисахаридами. В их составе обнаружен сравнительно небольшой набор моносахаридов: альдогексозы, аминоксахара, уроновые и сиаловые кислоты.

МОНОСАХАРИДЫ

Строение, конфигурация, конформация

Строение моносахаридов. Наиболее типичные моносахариды отвечают составу $C_nH_{2n}O_n$ и являются полиоксикарбонильными соединениями. В самом простом случае углеродная цепь содержит три атома. Таким образом, для альдоз ряд начинается с глицеринового альдегида, а для кетоз — с диоксиацетона (схемы 1 и 2).

Схема 1. Альдозы D-ряда

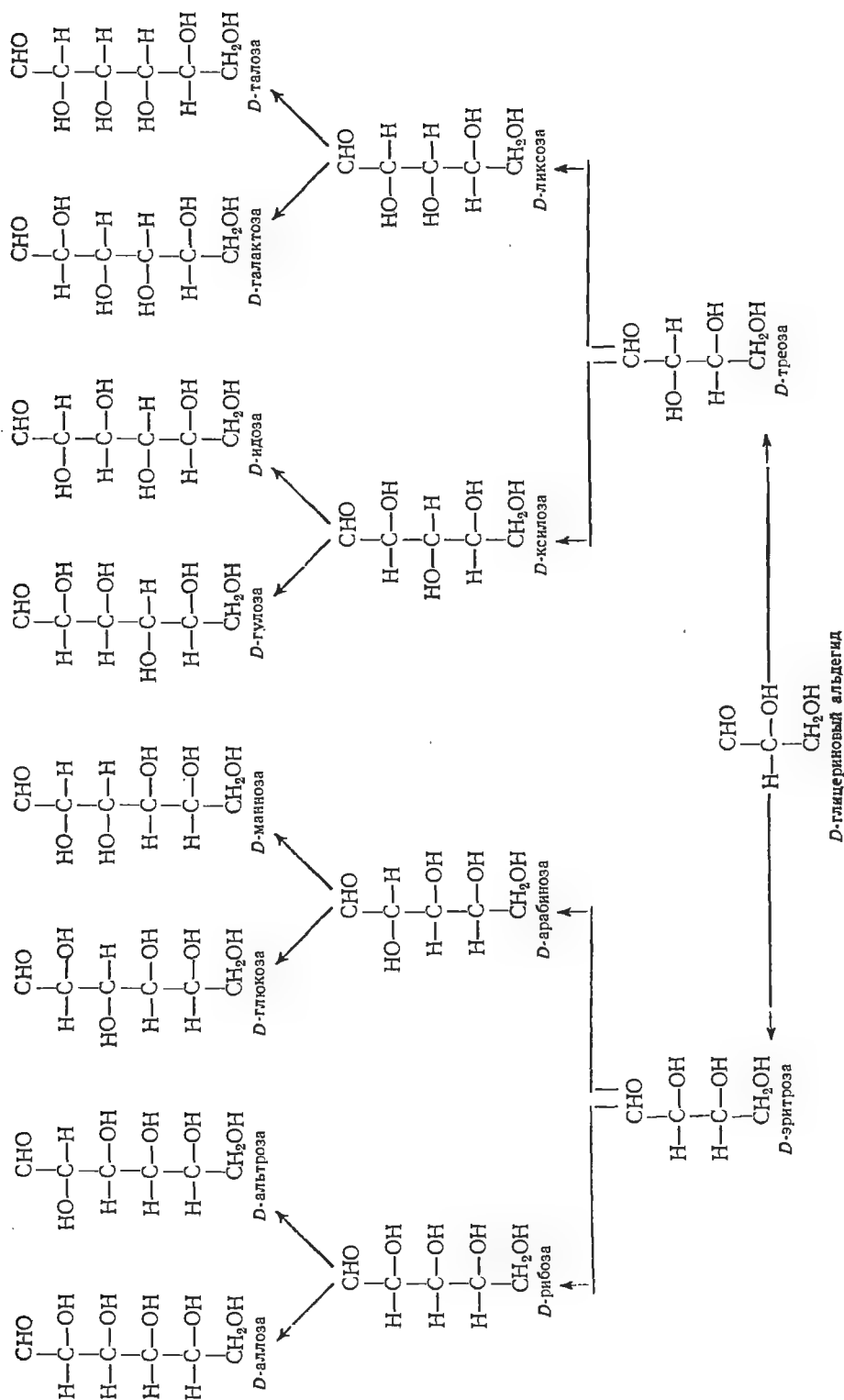
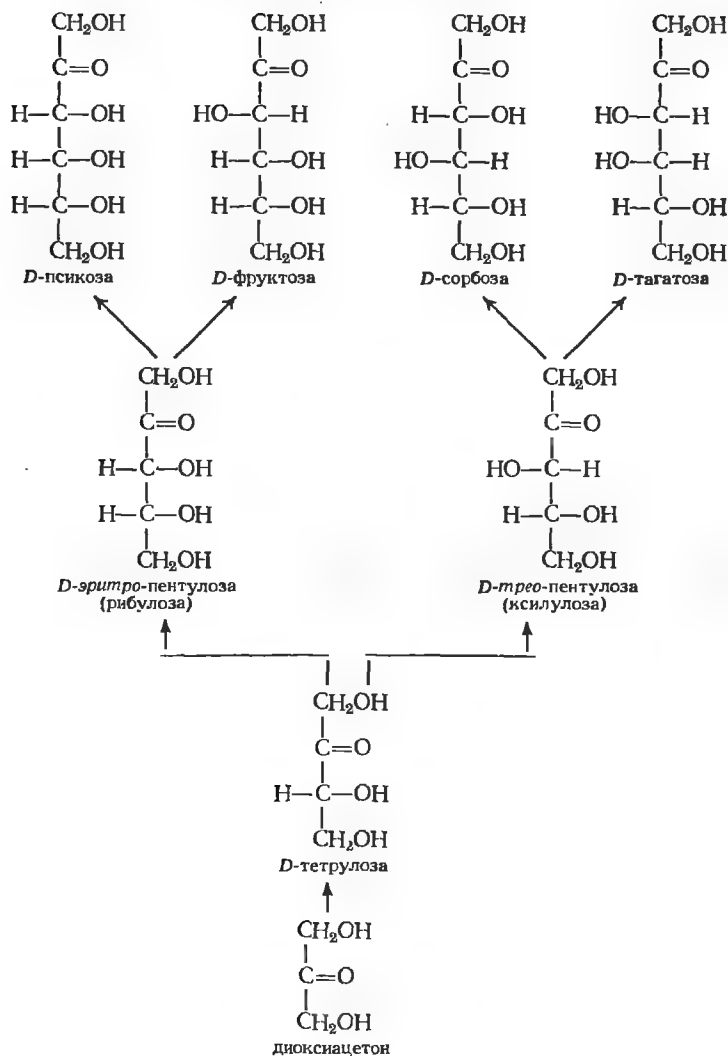


Схема 2. Кетозы D-ряда



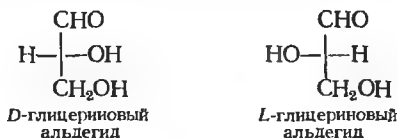
Конфигурация моносахаридов. В строении моносахаридов заложены возможности существования различных изомеров, так как они содержат хиральные* (асимметрические) атомы углерода. Соединения, отличающиеся расположением заместителей у хирального атома углерода, имеют различные конфигурации и называются конфигурационными изомерами или стереоизомерами. Так, тетрозы имеют два, пентозы — три и гексозы — четыре хиральных атома углерода. У тетроз

* Углеродный атом называют хиральным, если обмен любых двух из четырех тетраэдрически расположенных вокруг него лигандов дает неидентичные молекулы. Термин «лиганд» относится в равной мере как к атому, так и к функциональной группе.

имеются два различных по конфигурации изомера (эритроза и треоза), у пентоз — четыре (рибоза, арабиноза, ксилоза, ликсоза), у гексоз — восемь (аллоза, альтроза, глюкоза, манноза, гулоза, идоза, галактоза и талоза).

Наличие хиральных центров в молекулах моносахаридов обуславливает существование оптических изомеров. Каждой конфигурации соответствуют два оптических изомера: право- и левовращающий антиподы.

Конфигурация хирального атома моносахарида, соответствующая конфигурации хирального атома в глицериновом альдегиде, является определяющей для отнесения моносахарида к *D*- или *L*-ряду:



Представленные на схемах 1 и 2 моносахариды отнесены к *D*-ряду в соответствии с конфигурацией хирального углеродного атома с наибольшим порядковым номером.

Общее число стереоизомеров в сахарах определяется числом хиральных атомов углерода (*n*) и составляет 2^n .

Пентозы и гексозы существуют обычно в циклической форме, которая представляет собой полуацеталь (лактол). Эта форма возникает в результате нуклеофильной атаки углеродного атома карбонильной группы атомом кислорода достаточно удаленной спиртовой группы. В результате циклизации появляется новый хиральный атом углерода, и число изомеров удваивается по сравнению с ациклической формой. Вновь возникший хиральный центр называется гликозидным (или аномерным), а гидроксил, находящийся у этого атома углерода, — гликозидным. Изомеры относительно аномерного центра называются α - и β -аномерами.

При изображении моносахаридов *D*-ряда аномерный гидроксил расположен у α -аномера под плоскостью кольца, а у β -аномера — над плоскостью. Для *L*-ряда наблюдается обратное расположение.

Конфигурация при C_1 может быть определена экспериментально, в частности по электропроводности растворов комплексов моносахаридов с борной кислотой. α -Аномер *D*-глюкозы имеет *цис*-, а β -аномер — *транс*-конфигурации при C_1 и C_2 . В настоящее время принято называть α -аномерами соединения, имеющие одинаковые конфигурации при аномерном и определяющем принадлежность к *D*- или *L*-ряду хиральным атомам углерода, β -аномер имеет при этих атомах противоположные конфигурации:

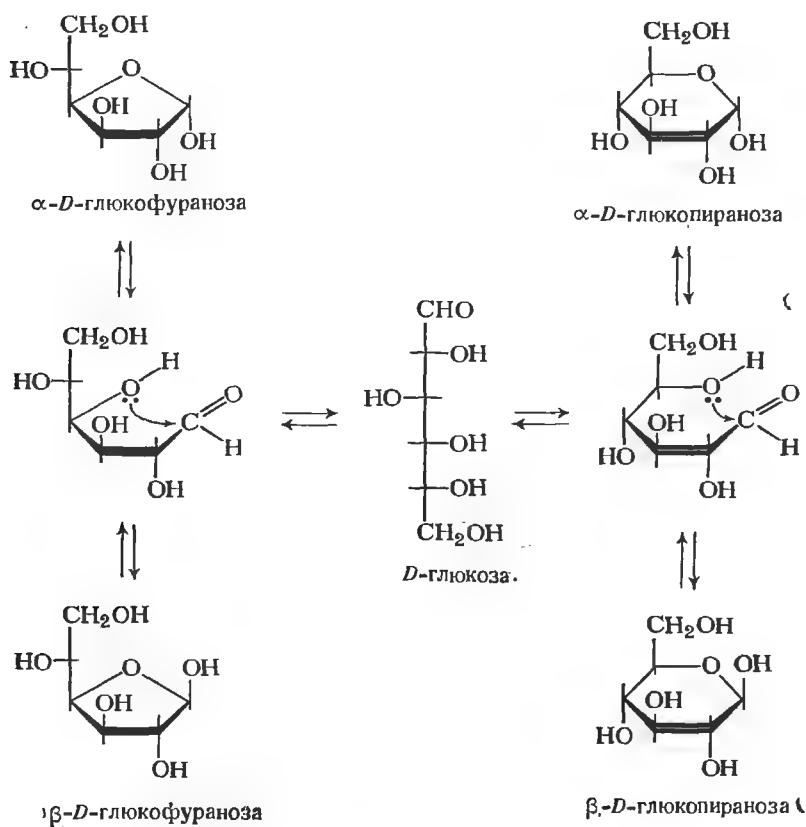
Конфигурация при C_1		
	α -аномер	β -аномер
<i>D</i> -ряд	<i>D</i>	<i>L</i>
<i>L</i> -ряд	<i>L</i>	<i>D</i>

У сахаров *D*-ряда α -аномер сильнее вращает плоскость поляризованного света вправо, чем β -аномер, в *L*-ряду α -аномер имеет более отрицательное вращение по сравнению с β -аномером.

Изомеры, отличающиеся конфигурацией других хиральных атомов, называются эпимерами. Так, глюкоза и манноза являются эпимерами по C₂.

Моносахариды проявляют способность к таутомерным превращениям. Им свойственна кольчато-цепная таутомерия. Наиболее хорошо эти превращения изучены на глюкозе. В водной среде при pH 6,9 в равновесном растворе глюкозы содержится только 0,0026% альдегидной формы (определяется полярографическим методом). Соотношение α - и β -аномеров в растворе зависит от природы растворителя. Так, в воде при комнатной температуре в равновесном растворе содержится 36% α -D-глюкозы и 64% β -D-глюкозы; $[\alpha]_D^{20}$ раствора +52,6°, в растворе же абсолютного метанола равновесная смесь содержит 45% α -аномера и 55% β -аномера [6].

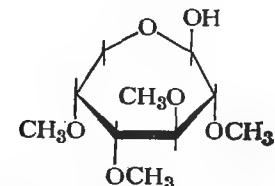
Кроме глюкопиранозных и ациклической форм в растворах глюкозы содержатся также глюкофуранозные формы. Взаимопереход циклических форм идет через альдегидную форму:



При растворении моносахарида и до достижения равновесного состояния наблюдается изменение оптического вращения раствора, из-

вестное под названием мутаротации, которое обусловлено аномеризацией (изменение конфигурации при C_1).

Обычно лактольные формы сахаров представлены фуранозами и пиранозами, но при наличии заместителей иногда могут реализоваться семичленные лактольные кольца (септанозы), например в случае 2,3,4,5-тетра-О-метил-*D*-глюкозы:



2,3,4,5-тетра-О-метил- β -*D*-глюкосептаноза

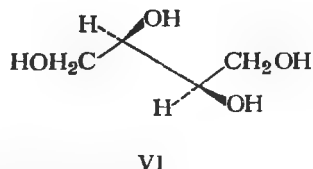
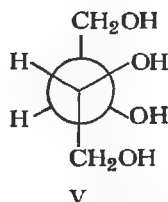
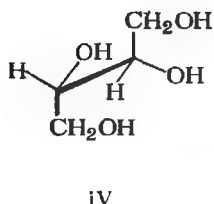
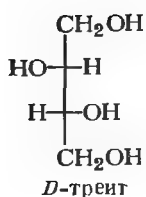
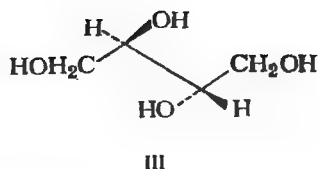
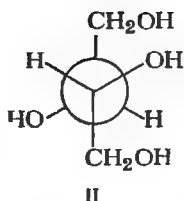
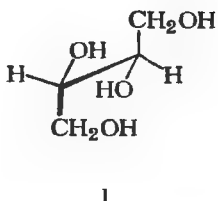
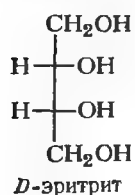
В кристаллическом состоянии моносахариды, как правило, устойчивы и существуют в виде пиранозных форм.

Конформация моносахаридов. Под термином конформация понимают различное пространственное расположение атомов в молекуле, полученное в результате поворота вокруг одной или более простых связей. Конформационные изомеры имеют одну и ту же молекулярную формулу, одинаковое строение, идентичные конфигурации, но различные конформации. Конформеры отличаются друг от друга свободной энергией, которая является функцией взаимодействия ковалентно несвязанных атомов и групп. Обычно это различие невелико, что определяет легкость взаимопревращений конформеров при обычной температуре. Однако иногда конформационные изомеры имеют достаточно высокий энергетический барьер, что позволяет изолировать отдельные изомеры; в этом случае их называют *атропизомерами*. Из большого числа возможных конформаций обычно реально существует несколько наиболее устойчивых форм, обладающих минимумом свободной энергии.

Конформеры и конфигурационные изомеры часто называют общим термином — стереоизомеры. Конфигурация характеризуется определенной оптической активностью, конформация же не имеет стабильной оптической активности.

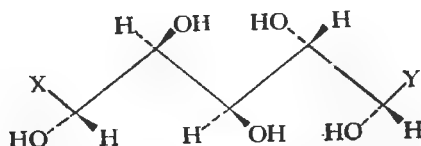
Конформации ациклических форм моносахаридов. С наиболее простым случаем мы встречаемся в ряду тетроз, которые имеют только одну центральную $C-C$ -связь, вокруг которой может происходить вращение. В соответствии с общими принципами конформационного анализа [7] для *D*-эритрита и *D*-треита наиболее стабильными являются трансoidные конформации, в которых CH_2OH -группы располагаются антипараллельно и, таким образом, максимально удалены друг от друга. Вицинальные гидроксильные группы при C_2 и C_3 в эритрите антипараллельны, а в треите находятся в *gauche*-ориентации ($\varphi=60^\circ$). Ниже изображены предпочтительные конформации *D*-эритрита и *D*-треита с применением перспективных формул I и IV (молекула рассматривается под углом 45° к центральной $C-C$ -связи), ньюменовских проекций II и V (молекула рассматривается вдоль центральной $C-C$ -связи)

и формы зигзага III и VI:



Необходимо обратить внимание на формальное несоответствие изображения фишеровских проекций D -эритрита и D -треита и их предпочтительных конформаций. Вицинальные гидроксильные группы при C_2 и C_3 в эритрите в фишеровской проекции изображены в *цис*-ориентации, т. е. они сближены, в действительности, как это представлено в конформационной формуле, они антипараллельны, т. е. максимально удалены. В D -треите в фишеровской проекции гидроксильные группы находятся в *транс*-положении, т. е. удалены, а в предпочтительной конформации — сближены*. Для обозначения такого рода стереохимических отношений принята специальная терминология (*трео*- и *эритро*-изомеры).

При увеличении числа углеродных атомов в молекуле предпочтительные конформации имеют зигзагообразное расположение основной углеродной цепи. При этом достигается наиболее выгодная ориентация замещающих групп вдоль углеродной цепи. В зигзагообразной конформации углеродный скелет располагается приблизительно в одной плоскости (на рисунке в плоскости бумаги), а заместители размещаются перед плоскостью или за ней:

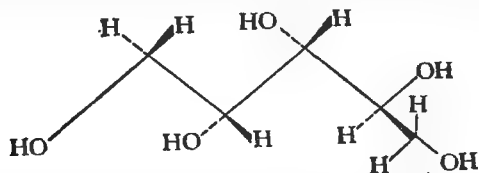


Наличие зигзагообразных конформаций ациклических форм моносахаридов подтверждается рентгенографическими исследованиями кристаллических структур [8] и методом ЯМР-спектроскопии [9].

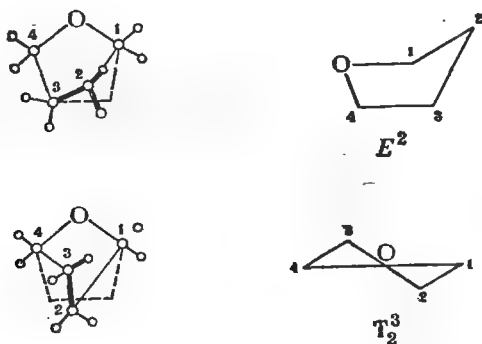
Иногда вследствие взаимодействия заместителей копланарность углеродного скелета может нарушаться, при этом обычно один угле-

* Фишеровские проекции отвечают высокоэнергетическим (заслоенным) конформациям, которые обычно не реализуются.

родный атом выходит из плоскости. Такие конформации называют серповидными [10, v. IА]. Конформация серпа определена для ксилита в растворе [9]. Она возникает из планарной зигзагообразной конформации в результате поворота вокруг связи C_2-C_3 , чтобы ослабить 1,3-син-взаимодействие между гидроксиллами при C_2 и C_4 :



Конформации циклических форм*. Конформации циклических форм моносахаридов зависят от размера цикла. Для фураноз и их производных характерны два типа конформаций, обусловленные тем, что тетрагидрофурановый цикл не плоский; в зависимости от характера заместителей из плоскости могут выступать один или два атома углерода:



В первом случае реализуется конформация E (от *envelope* — конверт), во втором — T (от *twist* — изогнутый). Более полное описание конформации достигается введением индексов, указывающих порядковый номер выступающего атома. Если атом выступает над плоскостью, то индекс ставится сверху, если под плоскостью, — то снизу. Для кислорода используют индекс «О».

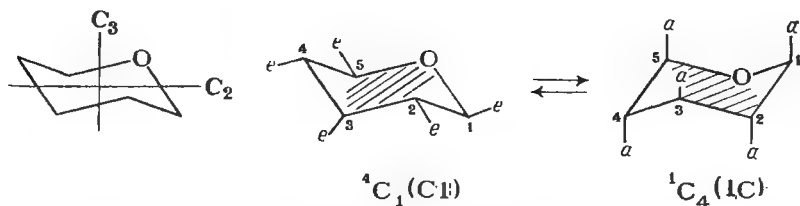
В случае фуранозного цикла возможно десять E и десять T конформаций.

Наименьшее взаимодействие между заместителями в фуранозном кольце наблюдается в том случае, когда из плоскости кольца выведен атом C_2 или C_3 , или оба вместе; в этих случаях возникают наиболее стабильные конформации.

Многочисленные исследования посвящены изучению конформаций пираноз, поскольку они широко представлены в структуре сложных природных соединений. Предпочтительной конформацией у пираноз по аналогии с циклогексаном является форма кресла. Возможны две конформации кресла, способные превращаться друг в друга в процессе внутренней конверсии и отличающиеся расположением заместителей: если в одном из конформеров заместители расположены эква-

* Термин «конформация» был введен Хеуорсом в 1929 г. Позднее терминология конформаций углеводов была разработана Ривзом.

ториально (*e*), то в другом — те же заместители занимают аксиальные положения (*a*)*:



C_2 — ось симметрии второго порядка, C_3 — ось симметрии третьего порядка, *a* — аксиальные заместители, *e* — экваториальные заместители. Плоскость кольца заштрихована.

Согласно терминологии Ривза [11], эти конформеры называются *C1* и *1C* (от *chair* — кресло); выступающие из плоскости атомы иногда обозначают индексами.

Нумерацию атомов в цикле осуществляют, как показано выше, кислород не нумеруют. Плоскость кольца выбирается так, чтобы на ней находились четыре атома кольца или чтобы углеродный атом с нижшим номером располагался вне плоскости. Нумерация ведется от верхнего атома по часовой стрелке.

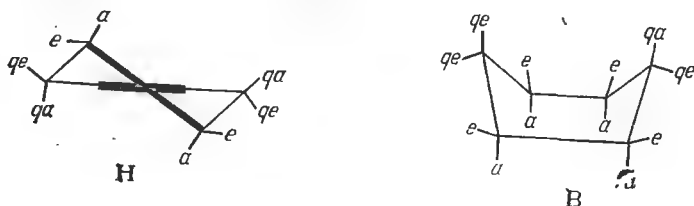
Порядковые номера атомов, выступающих над плоскостью, обозначаются индексом сверху, а атомы, лежащие ниже плоскости, — индексом снизу. Таким образом, конформацию *C1* обозначают как 4C_1 , а *1C* — 1C_4 . К сожалению, эти обозначения не отражают хиральность молекулы, поэтому в случае необходимости в скобках добавляют конформационный индекс, например ${}^4C_1(D)$, ${}^1C_4(D)$, ${}^4C_1(L)$ и ${}^1C_4(L)$.

Был предложен ряд других способов обозначения конформеров у пираноз [12], однако они не получили общего признания.

Менее стабильными, как это показано на примере циклогексана, являются конформации ванны (*boat*) *B*, полукресла (*halfchair*) *H* и изогнутой ванны (*twist-boat*) *S*, обладающие более высокой потенциальной энергией.

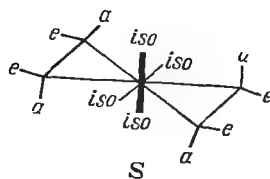
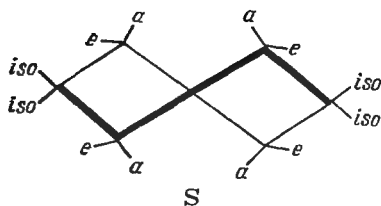
Переход конформации изогнутой ванны в ванну осуществляется в процессе псевдоротации, который заключается в одновременном и непрерывном изменении торсионных углов так, что каждый атом кольца последовательно занимает каждое из возможных положений в цикле.

В этих конформациях наряду с аксиальными и экваториальными заместителями имеются квазиаксиальные (*qa*), квазиэкваториальные (*qe*) и изоклинные (*iso*) заместители**:

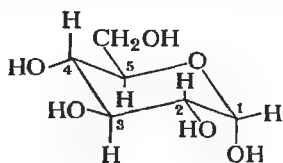


* Аксиальной называется связь, параллельная оси симметрии третьего порядка (C_3), экваториальная связь направлена под углом $109,5^\circ$ к оси симметрии третьего порядка.

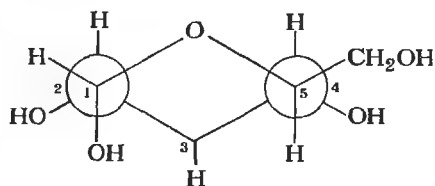
** Изоклинные называются заместители, которые связаны с атомом углерода, лежащим на оси симметрии второго порядка (C_2).



Таким образом, к двум конформациям кресла прибавляется по шесть конформаций ванны, полукресла и изогнутой ванны. Однако реально существуют только предпочтительные конформации. В предпочтительной конформации наибольшее число заместителей (в первую очередь, больших по объему) должно находиться в экваториальных положениях. Действительно, для многих пираноз характерно экваториальное расположение CH_2OH -группы:

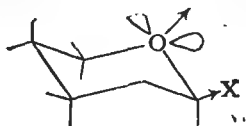


α -D-глюкопираноза



На устойчивость конформации моносахаридов сильное влияние оказывает так называемый Δ^2 -эффект, обусловленный присутствием в цикле атома кислорода. Δ^2 -Эффект проявляется в том случае, если гидроксил при C_2 расположен аксиально, а заместитель при C_1 — экваториально. При этом кислородные атомы гидроксильных групп при C_1 и C_2 и кислород цикла оказываются пространственно сближенными, что приводит к сильному отталкиванию одноименно заряженных атомов, вследствие чего конформация оказывается очень неустойчивой.

Второй эффект, связанный с влиянием кислорода в цикле, заключается в большей устойчивости производных по C_1 у α -аномера, несмотря на то, что в нем гидроксил занимает аксиальное положение, а в β -аномере — экваториальное. Этот эффект, называемый «аномерным», обусловлен взаимодействием диполя связи $\text{C}-\text{X}$ (в частном случае $\text{C}-\text{O}$) и суммарного диполя неподеленной пары электронов атома кислорода и электронов цикла. Если заместитель X экваториален, то угол между диполями мал и отталкивание сильнее, при аксиальном заместителе угол значительно больше и взаимодействие слабее:



Величина аномерного эффекта зависит от полярности связи $\text{C}-\text{X}$ и уменьшается в ряду:



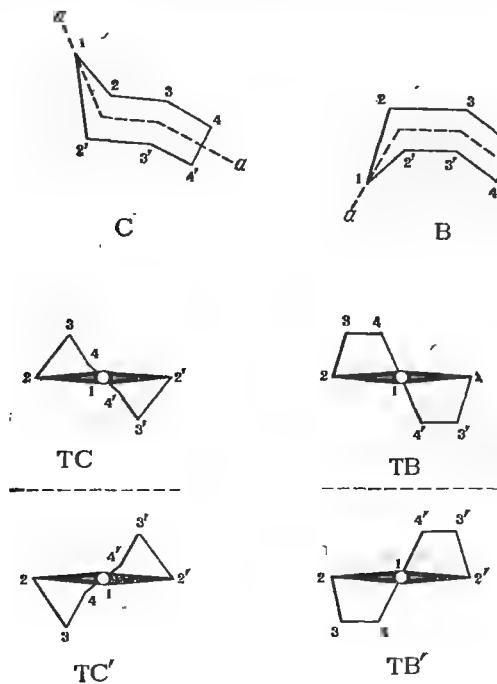
Ацилгликозилгалогениды, например, устойчивы при аксиальной ориентации галогена.

Перечисленные эффекты, снижающие устойчивость конформации, названы «факторами неустойчивости». Представление о них впервые сформулировано в 1955 г. Ривзом, определившим предпочтительные конформации альдогексоз. Многие из них были подтверждены в последующих исследованиях с применением методов ЯМР-спектроскопии и рентгеноструктурного анализа.

Экспериментально доказано, что в растворах обычно сохраняется та же конформация, что и в твердом состоянии. Растворитель не оказывает заметного влияния на конформацию, однако иногда определенная конформация может стабилизироваться за счет водородных связей [13]; в этих случаях природа растворителя может влиять на ее устойчивость. Поскольку разность между энергиями различных конформеров невелика, в растворах возможно присутствие их смеси.

Производные гексапираноз с *галакто*-, *глюко*- и *манно*-конфигурациями существуют в кристаллическом состоянии в виде ${}^4C_1(D)$ - или ${}^1C_4(L)$ -конформеров. Среди кристаллических пентапираноз 4C_1 -конформер найден у метил- β -D-ксилопиранозиды и β -D-ликозы, в то время как β -D-арабиноза и 2-дезоксиг- β -D-рибоза существуют как 1C_4 -конформеры.

Конформации семичленного цикла могут быть представлены следующими формами: кресла (C), ванны (B), изогнутого кресла (TC, TC') и изогнутой ванны (TB, TB'):



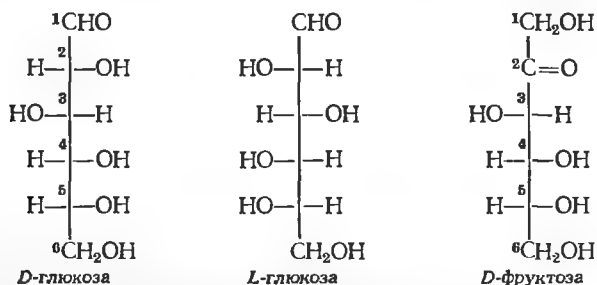
Наиболее устойчивы конформации кресла и изогнутого кресла, легко превращающиеся друг в друга в процессе псевдоротации.

Моносахариды редко встречаются в септанозной форме, и имеется очень небольшое число работ по исследованию их конформаций. Методом протонного магнитного резонанса [14] было определено наличие

септанозной формы 2,3,4,5-тетра-О-метил-*D*-глюкозы в хлороформном растворе, причем наряду с ациклической формой (40%) обнаружен только β-аномер (60%).

Способы изображения молекул моносахаридов. Номенклатура

Многообразие форм молекул моносахаридов предполагает различные способы их изображения. Для изображения ациклических форм моносахаридов приняты проекционные формулы Фишера, получающиеся при проектировании на плоскость тетраэдрических пространственных структур:

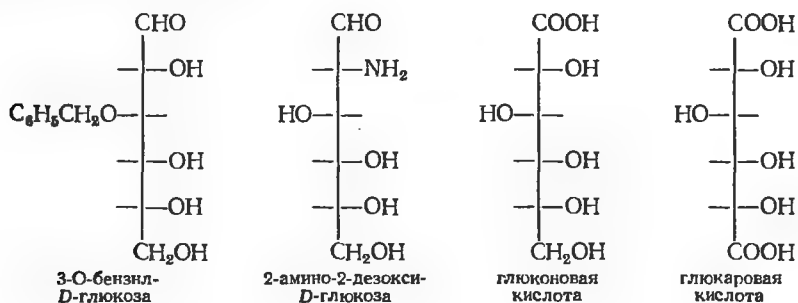


Допускается горизонтальное изображение формулы, в этом случае карбонильную группу располагают справа.

В альдозах нумерация начинается с альдегидной группы, в кетозах карбонильный атом углерода должен быть обозначен возможно более низким номером [15]. Конфигурационная принадлежность обозначается символами *D* и *L*. Если необходимо указать знак оптического вращения, то добавляются префиксы *декстро*- и *лево*- или знаки (+) и (—); рацемические формы обозначаются символами *DL* или (±), *мезо*-формы — префиксом *мезо*-, например: *D*-глюкоза, или *D*-(*декстро*)-глюкоза, или *D*-(+)-глюкоза; *D*-фруктоза, или *D*-(*лево*)-фруктоза, или *D*-(—)-фруктоза.

Для производных моносахаридов указывают положение заместителя и атом, с которым он связан. Если замещается спиртовая группа, то перед названием сахара помещают префикс *дезокс*-.

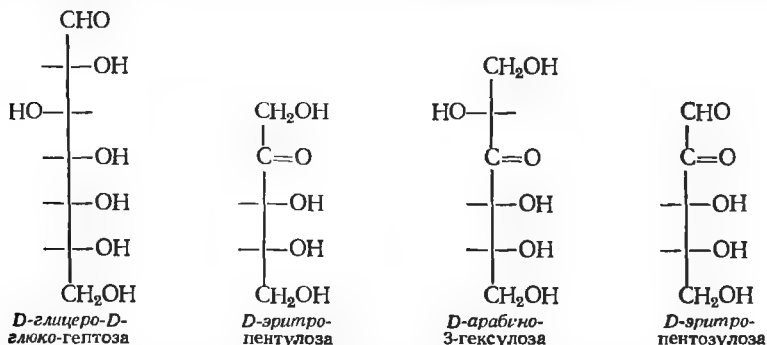
Одноосновные карбоновые кислоты, получающиеся в результате окисления альдегидной группы, называются альдоновыми, а дикарбоновые кислоты, образующиеся в результате окисления первого и последнего атомов углерода, — сахарными кислотами. Наименование монокрбоновых кислот включает окончание «оновая», а дикарбоновых — «аровая»:



Конфигурации, содержащие от одного до четырех последовательно расположенных хиральных центров, обозначаются префиксами:

Число хиральных атомов углерода	Префиксы
1	глицеро-
2	эритро-, трео-
3	арабино-, ликсо-, рибо-, ксило-
4	алло-, альтро-, галакто-, глюко-, гуло-, идо-, манно-, тало-

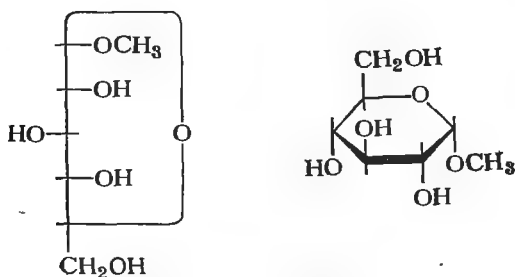
Если соединение содержит большее число хиральных атомов углерода, то используют два и более префиксов, например:



Кетозы с карбонильной группой у C_2 называют, используя окончание «улоза», перед ним ставится префикс, обозначающий число углеродных атомов в цепи. Если кетогруппа находится не у второго атома углерода, то цифрой, стоящей перед префиксом, обозначающим число углеродных атомов в цепи, указывают место карбонила. Моносахариды, содержащие одновременно альдегидную и кетонную группы, получают название соответствующей альдозы, в котором окончание «а» заменено на «улоза», перед последним ставят цифру, указывающую положение кетонной группы.

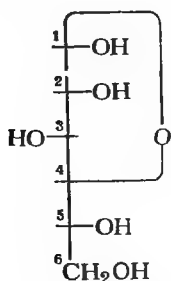
В номенклатуре циклических форм моносахаридов размер цикла отражается заменой окончания моносахарида «за» окончанием фураноза для пяти-, пираноза — для шести- и септаноза — для семичленного кольца. Для обозначения аномеров вводят дополнительно символы α - или β - непосредственно перед конфигурационными символами D или L.

Эфиры углеводов по гидроксигруппе аномерного центра носят название гликозидов и имеют окончание «зид»:

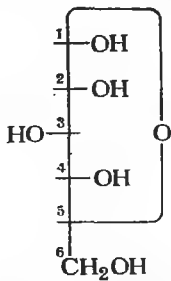


метил- α -D-глюкопиранозид

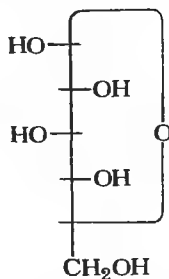
Циклические формы сахаров изображают формулами Толленса и «перспективными» формулами Хеуорса или Миллса [16]:



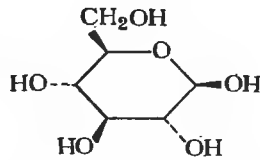
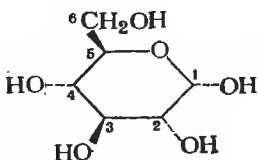
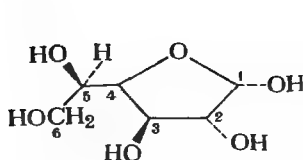
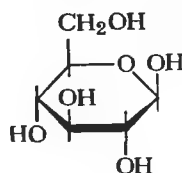
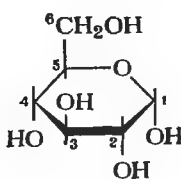
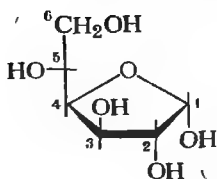
α -D-глюкофураноза



α -D-глюкопираноза



β -D-глюкопираноза



Для α -аномеров D-ряда полуацетальная гидроксильная группа расположена в формуле Фишера справа, в формуле Хеуорса под циклом, а в формуле Миллса соединена с циклом пунктирной линией (направление за плоскость цикла). В β -аномерах полуацетальный гидроксил размещен слева в формуле Фишера, над циклом в формуле Хеуорса, в формуле Миллса его связь с циклом изображена сплошной жирной линией (находится перед плоскостью цикла).

Свойства моносахаридов

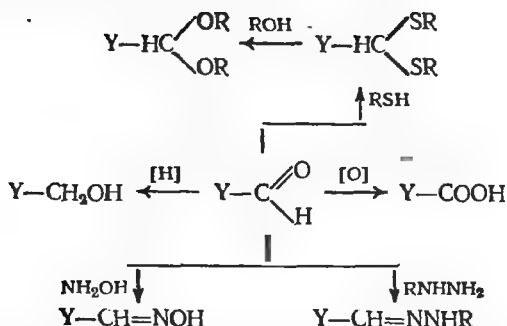
Химические свойства моносахаридов

Кристаллические формы моносахаридов, в том числе и индивидуальных аномеров, легко получают в виде аддуктов с неорганическими солями, например с хлористым кальцием или натрием.

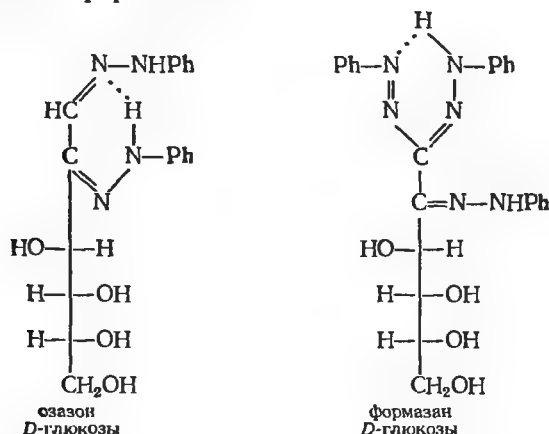
Моносахариды, являющиеся полифункциональными соединениями, дают многочисленные производные по карбонильной и гидроксильным группам.

Реакции с участием карбонильной группы. Карбонильные группы альдоз и кетоз проявляют реакции, характерные для карбонилсодер-

жащих соединений:



Они легко восстанавливаются при действии водорода в присутствии катализаторов (Ni, PtO₂ и др.), боргидридами и амальгамой натрия, окисляются при действии окислителей (Br₂, O₂/PtO₂ и др.) и раствора Фелинга (последняя реакция широко используется для определения восстанавливающих моносахаридов). При взаимодействии с меркаптанами образуются тиоацетали (меркапталы), имеющие ациклическую структуру. Они легко превращаются в ацетали и ациалы аль-форм, реагируя в первом случае со спиртами, а во втором — с уксусным ангидридом. При действии гидроксиламина и гидразинов образуются соответственно оксимы и гидразоны, в присутствии избытка арилгидразинов — озазоны и формазаны:



Образование озазонов объясняется возникновением в молекуле моносахарида новой карбонильной группы под действием арилгидразина, который выступает в данном случае в роли окислителя.

Реакции с участием спиртовых гидроксильных групп. Спиртовые гидроксильные группы моносахаридов вступают в реакции с производными кислот, спиртами, альдегидами и кетонами, давая при этом сложные и простые эфиры, циклические ацетали и кетали (алкилиденные производные).

Производные по спиртовым группам используются для характеристики моносахаридов и в синтезах олиго- и полисахаридов для временной защиты гидроксильных групп. Наиболее важные производные моносахаридов по спиртовым группам приведены в табл. 1. Обычно в молекуле моносахарида имеется один первичный гидроксил и несколько

Таблица 1. Производные моносахаридов по спиртовым гидроксильным группам

Производные	Условия введения замещающей группы*	Условия удаления замещающей группы
Сложные эфиры		
Ацетаты	$(\text{CH}_3\text{CO})_2\text{O}$ ($\text{C}_6\text{H}_5\text{N}$, ZnCl_2 , H_2SO_4) $(\text{CH}_3\text{CO})_2\text{O}$ (CH_3COONa , нагревание) CH_3COCl (C_6H_6 , $\text{C}_6\text{H}_5\text{N}$)	$\text{CH}_3\text{ONa} + \text{CH}_3\text{OH}$ $(\text{CH}_3\text{O})_2\text{Ba} + \text{CH}_3\text{OH}$ $\text{NH}_3 + \text{CH}_3\text{OH}$ HCl
Бензоаты	$\text{C}_6\text{H}_5\text{COCl}$ ($\text{C}_6\text{H}_5\text{N}$)	$\text{CH}_3\text{ONa} + \text{CH}_3\text{OH}$ $\text{NaOH} + \text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$
Карбанилаты	$\text{C}_6\text{H}_5\text{NCO}$ ($\text{C}_6\text{H}_5\text{N}$)	$\text{CH}_3\text{ONa} + \text{CH}_3\text{OH}$ $\text{NaOH} + \text{CH}_3\text{OH}$
Тозилаты	$\text{CH}_3\text{C}_6\text{H}_4\text{SO}_2\text{Cl}$ ($\text{C}_6\text{H}_5\text{N}$)	$\text{NaHg}_x + \text{CH}_3\text{OH} + \text{H}_2\text{O}$ $[\text{H}]/\text{Ni}$ LiAlH_4
Мезилаты	$\text{CH}_3\text{SO}_2\text{Cl}$ ($\text{C}_6\text{H}_5\text{N}$)	То же
Фосфаты	POCl_3 ($\text{C}_6\text{H}_5\text{N}$) $(\text{C}_6\text{H}_5)_2\text{POCl}$ ($\text{C}_6\text{H}_5\text{N}$)	H^+ , H_2O
Сульфаты	$\text{C}_6\text{H}_5\text{N} \cdot \text{SO}_3$ [$\text{C}_6\text{H}_5\text{N}$, $\text{HCON}(\text{CH}_3)_2$]	H^+ , H_2O
Нитраты	$\text{HNO}_3[(\text{CH}_3\text{CO})_2\text{O}, \text{H}_2\text{SO}_4]$ HNO_3 (CHCl_3)	Fe (или Mg) + CH_3COOH NH_2NH_2 LiAlH_4
Триметилсилильные	$(\text{CH}_3)_3\text{SiCl}$ ($\text{C}_6\text{H}_5\text{N}$) $(\text{CH}_3)_3\text{SiNHAc}$	ROH H_2O
Циклические сложные эфиры		
Карбонаты	COCl_2 ($\text{C}_6\text{H}_5\text{N}$, 0°C) $\text{CO}(\text{OC}_2\text{H}_5)_2$ ($\text{NaOH} + \text{H}_2\text{O}$, 0°C)	$\text{CH}_3\text{ONa} + \text{CH}_3\text{OH}$ $\text{NH}_3 + \text{CH}_3\text{OH}$
Фенилборонаты	$\text{C}_6\text{H}_5\text{B}(\text{OH})_2$ $(\text{C}_6\text{H}_5\text{BO})_3$ (ангидрид)	$\text{HOCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$
Циклофосфаты	POCl_3 ($\text{C}_6\text{H}_5\text{N}$) $\text{C}_6\text{H}_5\text{POCl}_2$ ($\text{C}_6\text{H}_5\text{N}$)	H^+ , H_2O
Простые эфиры		
Метилловые	CH_3I (Ag_2O , нагревание) $(\text{CH}_3)_2\text{SO}_4$ (30%-ный раствор NaOH) CH_3I ($\text{Na} + \text{NH}_3$ жидкий) CH_3I $(\text{CH}_3)_2\text{SO}_4$ $[\text{HCON}(\text{CH}_3)_2 + \text{Ag}_2\text{O}$ (или $\text{BaO})]$	$\text{HBr} + (\text{CH}_3\text{CO})_2\text{O}$ (нагревание); EtCl_3 (CH_2Cl_2)

Производные	Условия введения замещающей группы*	Условия удаления замещающей группы
Бензиловые	$C_6H_5CH_2Cl$ ($H_2O + NaOH$, нагревание) $C_6H_5CH_2Br$ [$HCON(CH_3)_2 + Ag_2O$ (или BaO)] $C_6H_5CH_2Cl$ (NaN) $(C_6H_5)_3CCl$ (C_6H_5N)	$[H]/Pd$, $[H]/Ni$ $Na + C_2H_5OH$
Тритиловые		$HBr + CH_3COOH$; $HCl + CHCl_3$; $[H]/Pd$; $[H]/PtO_2$; CH_3COOH (нагревание) $NaOCH_3 + CH_3OH$; $RSNa$; $LiAlH_4$; $[H]/Pd$
Внутренние эфиры (ангидросахара)	H_2SO_4 $NaOH$, $Ba(OH)_2$ (из тозилатов и галогидпроизводных)	

Циклические ацетали и кэтали

Бензилиденевые производные	C_6H_5CHO ($ZnCl_2$, нагревание или HCl , P_2O_5) $C_6H_5CHBr_2$ [C_6H_6 , $(CH_3)_3COK$]	$[H]/Pd$, $[H]/PtO_2$ $H_2O + 1\% HCl$ $H_2O + CH_3COOH$ ионообменная смола в H-форме
Изопропилиденевые производные	CH_3COCH_3 (H_2SO_4 , H_3PO_4 , $ZnCl_2$, $CuSO_4$)	$H_2O + 1\%$ минеральной кислоты $H_2O + CH_3COOH$ ионообменная смола в H-форме

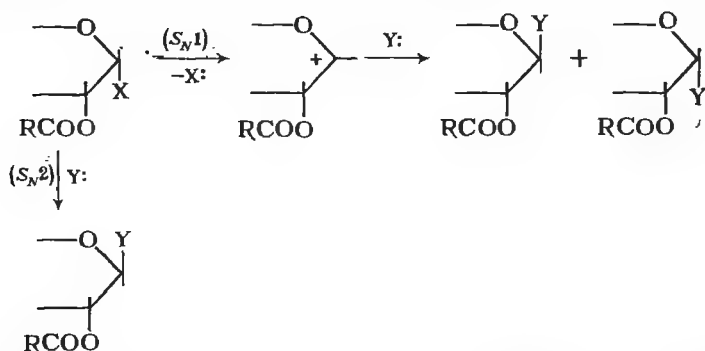
* В скобках указаны: растворитель, вещества, способствующие протеканию реакции, и температура реакции.

вторичных. Первичный гидроксил превосходит по реакционной способности вторичные гидроксилы и в отдельных случаях удается выделить производные по этому гидроксилу (например, тритильные производные). Среди вторичных гидроксидов в циклических формах моносахаридов резко выделяется по реакционной способности гликозидный гидроксил, в связи с этим производные по гликозидному гидроксилу рассмотрены особо.

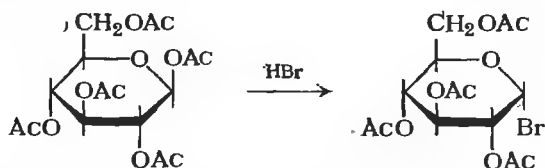
При получении производных по гидроксильным группам моносахаридов и последующем удалении замещающих групп необходимо иметь в виду возможность их миграции.

Реакции по гликозидному гидроксилу. Все рассмотренные выше реакции замещения гидроксильных групп моносахаридов свойственны и гликозидному гидроксилу. Однако в отличие от других спиртовых групп полуацетальный или гликозидный гидроксил (и его производные) легко вступает в реакции нуклеофильного замещения. Нуклеофильное замещение при гликозидном центре может протекать по механизмам S_N1 и S_N2 . При этом происходит частичная или полная ра-

цемизация при гликозидном центре или обращение конфигурации:



Особо важное значение имеет реакция замещения гликозидного гидроксила на галоген, осуществляемая действием хлористого или бромистого водорода в ледяной уксусной кислоте на ацильные производные моносахаридов:



Образующиеся при этом ацилгалогенозы широко используются в синтезе различных производных моносахаридов, в том числе и для получения О-гликозидов — основных фрагментов сложных углеводов. Фтор- и иодпроизводные, как правило, не используются, первые — вследствие незначительной реакционной способности, а вторые — из-за малой устойчивости.

Важнейшие реакции нуклеофильного замещения при гликозидном центре моносахаридов приведены на стр. 28 (см. схему I).

Переход от ацилгалогенозов к О-гликозидам может осуществляться действием на ацилгалогенозы спиртов и через ортоэфиры.

Ортоэфиры [17] возникают в результате соучастия соседней ацил-оксигруппы при нуклеофильном замещении у гликозидного центра (см. схему II на стр. 28).

Образующийся промежуточный ортоэфирный катион VII как амбидентный катион может реагировать с нуклеофильным реагентом по двум направлениям с образованием О-гликозида VIII или ортоэфира IX. Последний может превращаться в О-гликозид [18] при действии спирта в присутствии определенного количества катализатора (0,02—0,1 моль бромной ртути на 1 моль ортоэфира).

Превращения моносахаридов под действием кислот и оснований. В присутствии кислот и оснований моносахариды претерпевают ряд превращений, обусловленных главным образом енолизацией и прототропными сдвигами.

Многие моносахариды достаточно устойчивы в разбавленных водных растворах минеральных кислот. При увеличении концентрации кислоты изменяется значение мутаротации, происходит расщепление на фрагменты, обычно на триозы, иногда — образование ангидросоеди-

Схема I

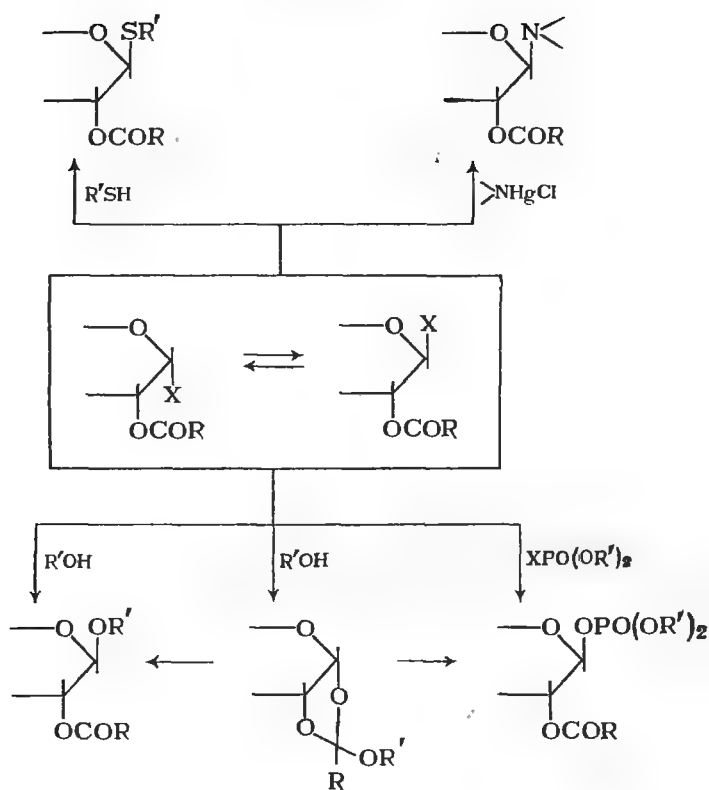
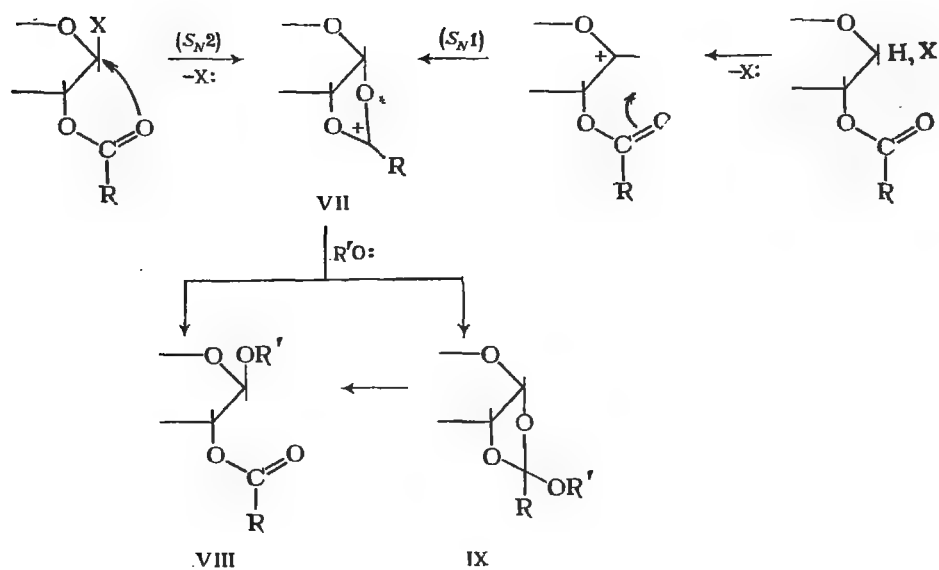


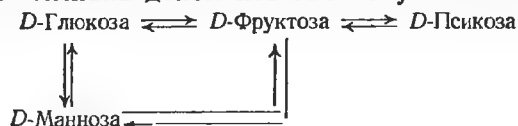
Схема II



нений и олигосахаридов. В присутствии концентрированных кислот моносахариды превращаются в производные фурана [19].

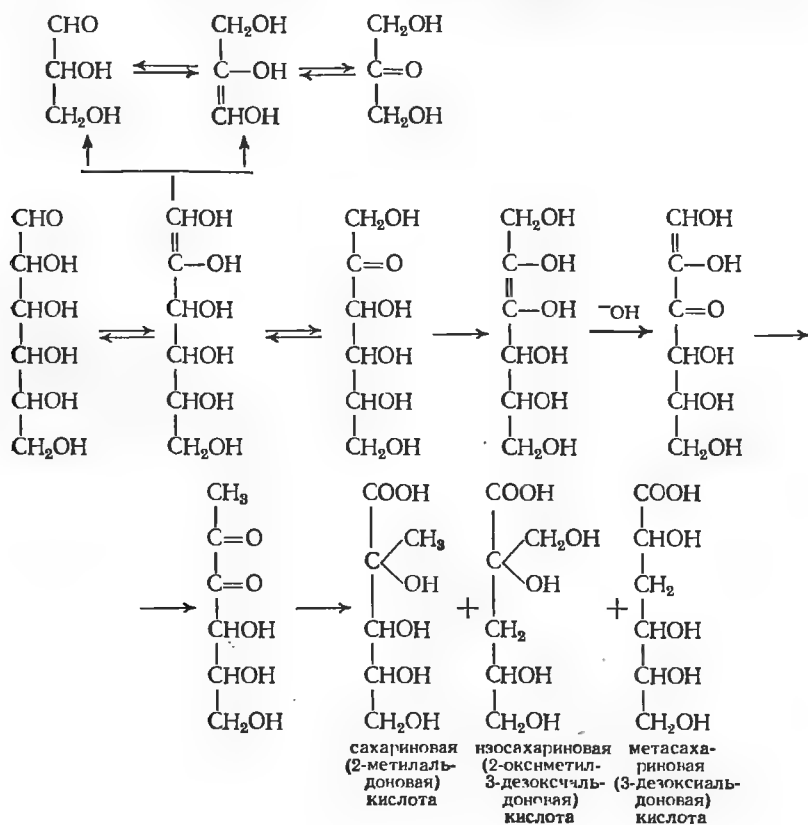
В щелочной среде моносахариды претерпевают изомеризацию, расщепление на фрагменты с меньшим числом углеродных атомов и окисление до сахариновых кислот.

Изменения в структуре моносахаридов под действием кислот и оснований начинаются с енолизации. Дальнейшие превращения енола различны в зависимости от pH среды. Эти превращения были подробно изучены и получили название реакции Лобри де Брюина — Альберда ван Экенштейна [20]. Реакция заключается в превращении альдогексозы в эпимер и соответствующую кетозу или смесь эпимерных по C₃ кетоз. Глюкоза превращается в смесь *D*-маннозы и *D*-фруктозы, а под действием аммиака дополнительно получается *D*-психоза:



Реакция более эффективно протекает в присутствии оснований, в том числе и органических.

В сильнощелочных средах происходят более глубокие изменения: ретроальдовый распад, приводящий к образованию глициринового альдегида и диоксиацетона, и окисление до сахариновых кислот:



Физические свойства моносахаридов

Моносахариды — бесцветные вещества, хорошо растворимые в воде, менее растворимые в спиртах, пиридине, уксусной кислоте. Многие из моносахаридов выделены в кристаллическом состоянии, однако процесс кристаллизации требует соблюдения определенных предосторожностей [21].

Оптическое вращение. Оптическое вращение в ряду углеводов не только дает необходимую информацию об оптической чистоте соединений, но позволяет иногда судить об их конфигурации и конформации.

Молекулярное вращение определяется по формуле

$$[M] = (M[\alpha])/100$$

где $[\alpha]$ — удельное вращение, M — молекулярная масса.

Удельное вращение вычисляют по формуле

$$[\alpha] = 100\alpha/(lc)$$

где α — наблюдаемый угол вращения, l — длина трубки (в дм), c — концентрация (в г/100 мл).

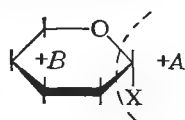
Удельное вращение зависит от длины волны света, температуры, характера растворителя и концентрации вещества. Обычно определение удельного вращения проводят при длине волны света 589 нм (натриевая лампа). Измеренное таким образом удельное вращение обозначается $[\alpha]_D$ (температура указывается индексом сверху), в скобках приводятся концентрация и растворитель, например $[\alpha]_D^{20} + 95^\circ$ (c 1 в CHCl_3).

α -Аномеры по сравнению с β -аномерами обладают более сильным положительным вращением:

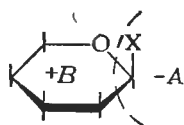
	$[M]_D$	
	α -аномер	β -аномер
Метил- <i>D</i> -маннопиранозид	+154	—135
Метил <i>D</i> глюкопиранозид	+309	—66
Метил- <i>D</i> -галактопиранозид	+380	0

Исходя из «принципа оптической суперпозиции», сформулированного Вант-Гоффом и заключающегося в том, что молекулярное вращение вещества равно алгебраической сумме вращений всех его асимметрических атомов, Хадсон установил несколько правил в ряду углеводов (правила изоротации), отражающих корреляцию оптического вращения со структурой.

Согласно Хадсону, числовое значение молекулярного вращения циклической формы гексопираноз можно представить как сумму двух компонент: A — вклад аномерного центра с заместителями, B — вклад всей остальной части молекулы:



$$[M]_{\alpha} = B + A$$



$$[M]_{\beta} = B - A$$

Разность числовых значений молекулярного вращения двух аномеров является величиной постоянной (2A), определяющейся характером заместителей при аномерном центре и не зависящей от конфигурации (в некоторых случаях и от заместителей) при остальных хиральных центрах

$$[M]_{\alpha} - [M]_{\beta} = B + A - B + A = 2A$$

а сумма числовых значений молекулярного вращения двух аномеров для различных производных одной и той же альдозы не зависит от природы заместителей при аномерном центре и является константой (2B):

$$[M]_{\alpha} + [M]_{\beta} = B + A + B - A = 2B$$

Экспериментальные данные достаточно хорошо согласуются с правилами Хадсона. Некоторые отклонения могут быть объяснены влиянием конформации моносахарида, в которой отчетливо проявляется различие между аксиальным и экваториальным гидроксильными группами при C₂.

На основании второго правила изоротации можно делать выводы о размере цикла, так как константа 2B для пиранозной и фуранозной форм различна. Так, в случае глюкозы значение молекулярного вращения в растворах соответствует константе 2B пиранозной формы. (Наличие пиранозной формы в растворах глюкозы подтверждается и другими данными.)

Второе правило изоротации может нарушаться при наличии неопределенных, ароматических или сильно поляризующихся заместителей при аномерном центре.

Ряд других правил Хадсона (лактонное, амидное, фенилгидразидное и бензимидазольное) имеют более ограниченное применение и здесь не будут рассмотрены.

Спектры моносахаридов и их производных. При установлении структуры моносахаридов и их производных широко привлекаются спектральные данные. Наиболее информативными для данного класса соединений являются инфракрасные спектры, спектры ядерного магнитного резонанса и масс-спектры. Электронные спектры имеют подчиненное значение и могут быть получены только для производных моносахаридов, содержащих хромофорные группы.

ИК-Спектры. В случае моносахаридов и их производных ИК-спектры используются для подтверждения присутствия функциональных групп (гидроксильных и карбонильных), установления размера кольца, конформаций, стереохимии аномерного центра и идентификации с заведомым образцом.

ИК-Спектры свободных моносахаридов обычно снимают в таблетках с бромистым калием или в вазелиновом масле. Изучение ИК-спектров моносахаридов в растворах ограничено вследствие плохой растворимости моносахаридов в традиционных для ИК-спектроскопии растворителях (CCl₄, CHCl₃ и др.), а применение водных растворов связано с использованием специальной техники. Производные моносахаридов, способные растворяться в вышеуказанных растворителях, исследуются также в растворах. В этом случае полученная информация значительно полнее, особенно ценны данные о наличии и характере во-

дородных связей. Наиболее характерные частоты ИК-спектров моносахаридов приведены ниже:

	Характеристические частоты, см ⁻¹
Гидроксильная группа	3650—3500
свободная	3650—3630
участвующая в образовании водородной связи	3600—3500
Карбонильная группа	1850—1550
Пиранозное кольцо	
антисимметричные колебания	917±13
симметричные колебания	770±14
Фуранозное кольцо	
колебания кольца	924±13
деформационные колебания	
C—H-связи	799±17
C—H-связь при аномерном центре	
экваториальная	844±8
аксиальная	891±7
C—O-связь у аномерного центра в ацетатах моносахаридов	
экваториальная	1128
аксиальная	1160
Идентификация с имеющимся образцом	4000—650
	1250—650 (область отпечатков пальцев)

Типичный ИК-спектр моносахаридов [22] приведен на рис. 1. Данные ИК-спектров достаточно широко применяются при исследовании структуры моносахаридов, но они не всегда надежны. Поэтому

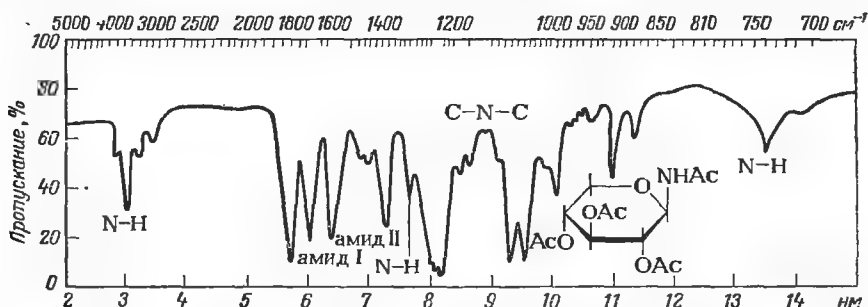


Рис. 1. ИК-Спектр N-ацетил-2,3,4-три-О-ацетил-β-D-ксилопиранозиламина (в таблетках с KCl).

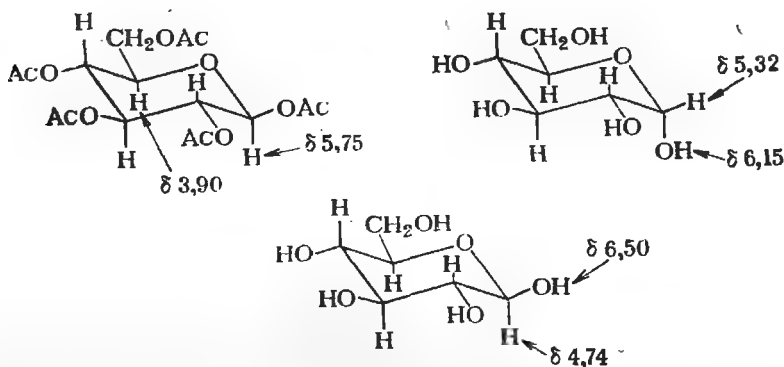
му их следует подкреплять данными других физико-химических методов.

ЯМР-Спектры. ЯМР-Спектроскопия является наиболее эффективным методом при изучении структуры моносахаридов. Впервые этот метод был применен Лемье в 1957 г. для определения структуры ацетилированных моносахаридов. К настоящему времени наиболее детально исследованы спектры протонного магнитного резонанса (ПМР), в последние годы начали изучаться ЯМР-спектры на ядрах ¹³C (СМР-спектры).

Для ЯМР-спектроскопии используют различные растворители (CCl₄, CDCl₃, CD₃OD, CD₃COOD, D₂O и др.), что значительно расширяет границы применения этого метода.

Значения химических сдвигов* и констант спин-спинового взаимодействия** позволяют судить о присутствии функциональных групп, конфигурации атомов и конформации молекулы [23].

В циклических формах моносахаридов водородный атом при аномерном центре имеет сигнал при наименьшем значении напряженности магнитного поля, поскольку он менее экранирован вследствие того, что находится у ацетального углеродного атома, соединенного с двумя атомами кислорода:



Различие в химическом сдвиге между экваториальным и аксиальным протоном составляет около $0,5 \text{ млн}^{-1}$, причем сигнал экваториального протона обнаруживается при более низких значениях напряженности магнитного поля.

Сигнал водородных атомов экваториальной метоксильной группы также обнаруживается при более низких значениях напряженности магнитного поля по сравнению с сигналом аксиальной метоксильной группы. Напротив, сигнал водородных атомов экваториальной ацетоксигруппы обнаруживается при более высоких значениях напряженности магнитного поля по отношению к сигналу аксиальной ацетоксигруппы.

Спин-спиновое взаимодействие наиболее сильно проявляется между протонами, находящимися у соседних углеродных атомов. В некоторых случаях могут взаимодействовать и более удаленные атомы. В системе $\text{H}_1-\text{C}_1-\text{C}_2-\text{H}_2$ значение константы спин-спинового взаимо-

* Химическим сдвигом называется положение сигнала протона относительно сигнала протона стандартного вещества, обычно тетраметилсилана (ТМС). Приняты две системы измерения химического сдвига: δ -шкала, в которой положение сигнала ТМС принимается равным 0, и τ -шкала, где положение сигнала ТМС считается равным 10. В обоих случаях химический сдвиг выражается в безразмерных единицах, млн^{-1} (миллионные доли). Перевод из одной шкалы в другую осуществляется по уравнению:

$$\tau = 10 - \delta$$

Химический сдвиг протона зависит от природы соседних атомов и от ориентации его в пространстве. Интенсивность сигнала пропорциональна числу однотипных протонов.

** Константой спин-спинового взаимодействия (J) называется расстояние между пиками, на которые расщепляется сигнал от взаимодействия с соседними протонами. Мультиплетность сигнала определяется числом взаимодействующих протонов. Константа спин-спинового взаимодействия выражается в герцах и зависит от пространственного расположения взаимодействующих протонов.

действия зависит от торсионного угла φ между связями C—H и определяется по уравнению Карпласа:

$$J_{H_1H_2} = 8,5 \cos^2 \varphi - 0,3 \text{ при } 0^\circ \leq \varphi \leq 90^\circ$$

$$J_{H_1H_2} = 9,5 \cos^2 \varphi - 0,3 \text{ при } 90^\circ \leq \varphi \leq 180^\circ$$

Графическое выражение этой зависимости представлено на рис. 2.

Наибольшее значение константа спин-спинового взаимодействия вицинальных протонов (7—10 Гц) имеет при их антиперипланарном ($\varphi \approx 180^\circ$) расположении в пиранозном цикле, а наименьшее (1—4 Гц) при синклинальном расположении ($\varphi \approx 60^\circ$). В ПМР-спектре равновесного раствора *D*-глюкозы в D_2O в низком поле наблюдаются два дублета. Один из них, расположенный при δ 5,32, соответствует экваториальному аномерному протону (α -аномер) и имеет $J_{H_1H_2} \approx 3,5$ Гц, что

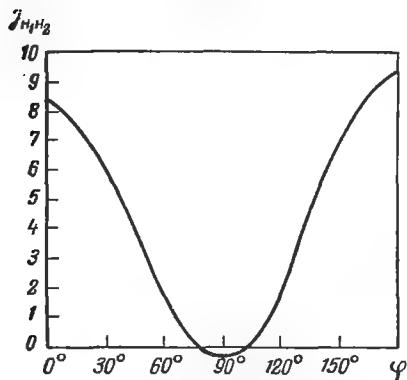


Рис. 2. Зависимость константы $J_{H_1H_2}$ от торсионного угла φ .

согласуется с синклинальным расположением протонов при C_1 и C_2 . Второй дублет с $J_{H_1H_2} 7,5$ Гц находится в более высоком поле (δ 4,74) и принадлежит аномерному протону (β -аномер), расположенному антиперипланарно в 4C_1 -конформере.

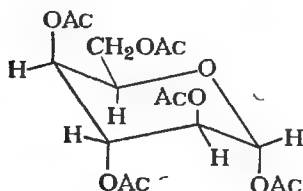
Если в системе $H_1-C_1-C_2-H_2$ при углероде имеется электроотрицательный заместитель, то константа спин-спинового взаимодействия меньше, чем предсказывает графическая зависимость (см. рис. 2). Для пираноз с аксиальным протоном при C_1 и экваториальным протоном при C_2 J 1,0—1,5 Гц. Если протон при C_1 расположен экваториально, а при C_2 — аксиально, то J 2,5—3,5 Гц.

Взаимодействие удаленных друг от друга протонов значительно слабее и характеризуется меньшими значениями констант спин-спинового взаимодействия, что может быть проиллюстрировано на примере пентаацетата α -*D*-идопиранозы:

$$J_{H_1H_3} 1,0 \text{ Гц}$$

$$J_{H_2H_4} 0,9 \text{ Гц}$$

$$J_{H_1H_4} 0,6 \text{ Гц}$$



Метод ПМР позволяет фиксировать тонкие конформационные различия, используя ядерный эффект Оверхаузера, который состоит в увеличении интегральной интенсивности сигнала протона при облучении соединения на частоте резонанса группы, находящейся в *цис*-положении к этому протону [24].

По ПМР-спектрам борсодержащих комплексов углеводов можно определять размер кольца. Так, в спектрах комплексов *D*-глюкозы при увеличении pH появляются 2 резких дублета (5,93 и 5,85), соответствующие фураноидной и пираноидной формам (рис. 3) [25].

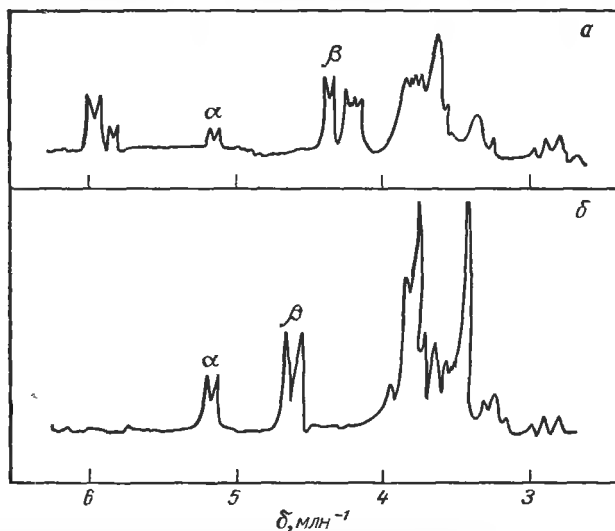


Рис. 3. ПМР-Спектр *D*-глюкозы (50 мг/мл) в D_2O в присутствии фенилборной кислоты (частота 100 МГц, сигналы фенила и DOH исключены):

a — при pH 12; *б* — при pH 7,0.

Спектры на ядрах ^{13}C позволяют фиксировать каждый углерод молекулы (см. табл. 2) [26].

Таблица 2. ^{13}C -Химические сдвиги некоторых альдопираноз и метилальдогексипиранозидов (млн $^{-1}$, внешний эталон CS_2)

Соединение	C_1	C_2	C_3	C_4	C_5	C_6	C в группе OCH_3
<i>D</i> -Глюкоза							
α -	100,4	120,9	119,5	122,8	121,2	131,4	
β -	96,5	118,2	116,6	122,8	116,6	131,4	
<i>D</i> -Галактоза							
α -	100,0	123,5	123,5	123,8	122,0	131,2	
β -	95,8	120,2	119,5	123,1	117,3	131,4	
<i>D</i> -Манноза							
α -	97,6	121,0	121,5	124,9	119,8	130,7	
β -	98,2	120,8	118,7	125,2	115,9	130,7	
Метил- <i>D</i> -глюкопиранозид							
α -	92,9	120,6	118,9	122,4	120,9	131,3	137,2
β -	89,1	119,1	117,3	122,5	117,3	131,1	135,0
Метил- <i>D</i> -галактопиранозид							
α -	93,0	122,9	122,6	123,9	121,6	131,0	137,2
β -	88,7	121,6	119,5	123,7	117,5	131,4	135,4
Метил- <i>D</i> -маннопиранозид							
α -	91,8	122,0	122,7	125,8	120,1	131,6	137,5
β -	91,5	122,2	119,5	125,7	116,2	131,4	135,9

На ^{13}C -химический сдвиг влияет электронная плотность. Аномерный углеродный атом, связанный с двумя атомами кислорода, имеет пониженную электронную плотность по сравнению с другими углеродными атомами, и его химический сдвиг находится в относительно слабом поле в области 88—102 млн $^{-1}$. Остальные атомы кольца резонируют в более высоком поле, и их химические сдвиги обнаруживаются в области 116—133 млн $^{-1}$. ^{13}C -Химический сдвиг зависит также от природы и ориентации заместителей у углеродного атома и соседних с ним атомов (см. табл. 2).

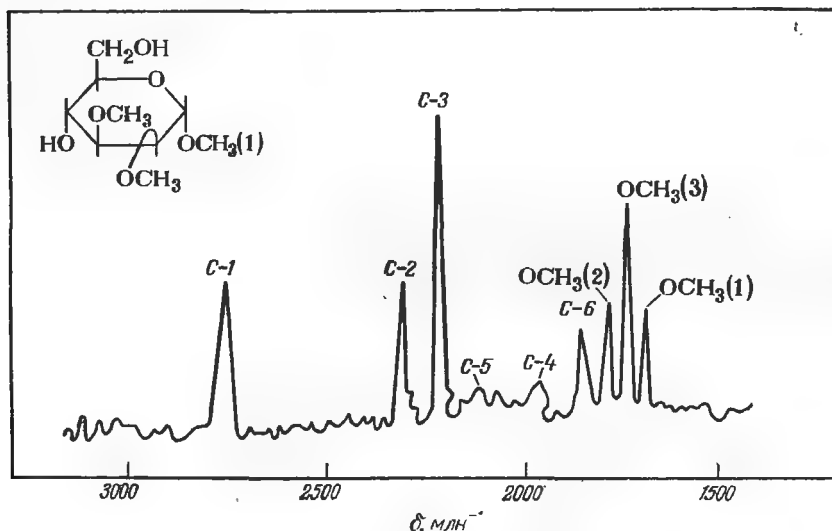


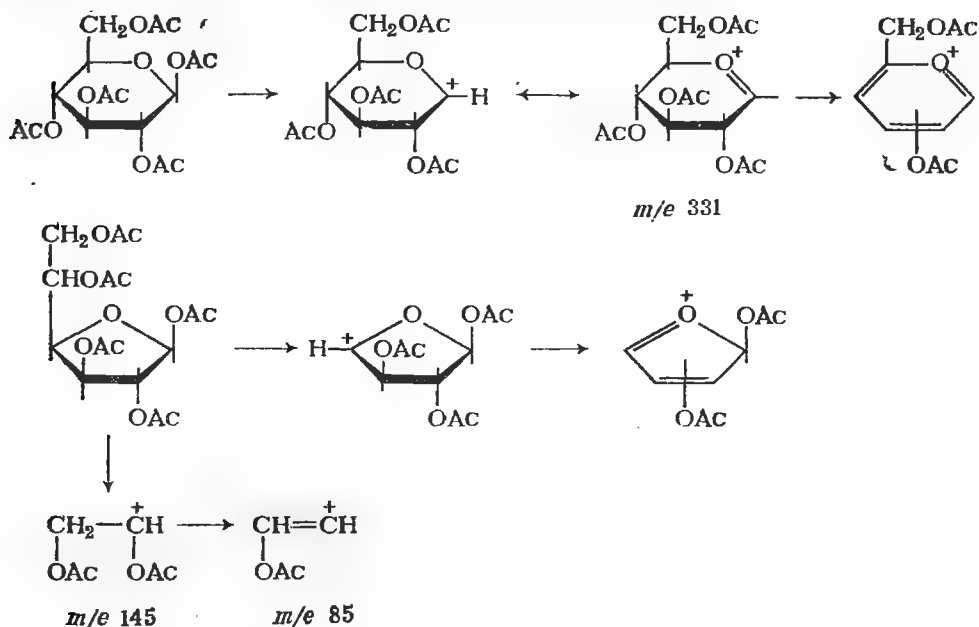
Рис. 4. ЯМР-Спектр на ядрах ^{13}C метил-2,3-ди-О-метил- α -D-маннопиранозида в присутствии тетрабората натрия в D_2O .

Еще более сильные сдвиги происходят при комплексообразовании с борной кислотой. На рис. 4 приведен ЯМР-спектр на ядрах ^{13}C для комплекса метил-2,3-ди-О-метил- α -D-маннопиранозида с борной кислотой [27].

Масс-спектры. Под действием электронного удара молекула ионизируется и далее распадается на фрагменты, которые фиксируются в масс-спектре в виде пиков, каждый из которых отвечает ионам с данным отношением массы к заряду (m/e). Поскольку заряд обычно равен единице, то m/e соответствует массе иона. Для получения масс-спектров моносахаридов их переводят в летучие соединения, что чаще всего достигается ацелированием или метилированием гидроксильных групп [28].

Характер фрагментации у ациклических и циклических форм моносахаридов различен. Ациклические формы образуют фрагменты в результате разрыва С—С-связей углеродного скелета моносахарида; в циклических формах наиболее легко разрушаются связи вблизи гликозидного центра. В фуранозах легко разрушается связь C_4 — C_5 . Неко-

торые наиболее типичные фрагменты, образующиеся при распаде пентаацетатов пираноз и фураноз [29], приведены ниже:



Масс-спектр пентаацетата α -D-глюкозы приведен на рис. 5.

Пентаацетат D-глюкозы под действием электронного удара первоначально теряет одну ацетоксигруппу, давая фрагмент с m/e 331. Такая

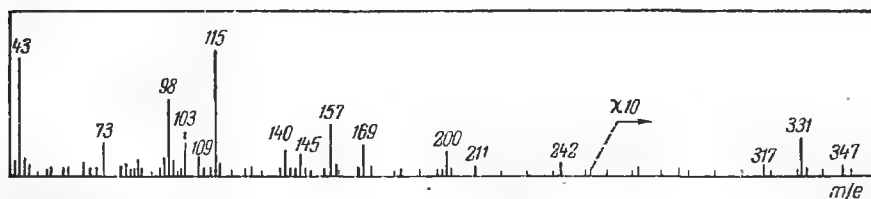


Рис. 5. Масс-спектр пентаацетата α -D-глюкозы.

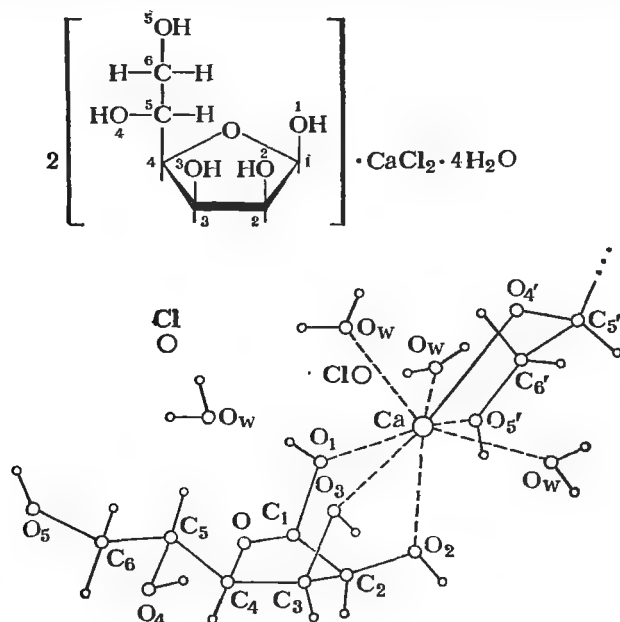
селективная фрагментация использована для анализа небольших олигосахаридов [30].

Дисперсия оптического вращения и круговой дихроизм. Методы дисперсии оптического вращения (ДОВ) и кругового дихроизма (КД) не нашли широкого применения в химии углеводов вследствие того, что наиболее информативная область этих спектров (190—210 нм) часто недоступна для измерений по техническим причинам. В некоторых случаях в этих спектрах при наличии замещающих групп удается наблюдать различия для конфигурационных изомеров и конформеров. Спектры ДОВ отличаются для α - и β -аномеров и для сахаров, имеющих различные конфигурации при других атомах углерода.

Метод ДОВ применен для изучения конформаций моносахаридов в группоспецифических веществах крови [31] и олигосахаридах молока.

Рентгеноструктурный анализ. Наиболее полная информация о структуре соединения получается с помощью рентгеноструктурного анализа, однако примеры определения структуры моносахаридов этим методом немногочисленны. Определенные трудности представляет получение кристаллических образцов моносахаридов с неорганическими солями.

Структура комплекса β -D-маннофураноза $\cdot$ $\text{CaCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, полученная в результате рентгеноструктурного анализа [32], приведена ниже:



Видно, что фуранозный цикл имеет конформацию конверта с выступающим из плоскости C_2 (на 0,05 нм) (конформация E_2), при C_1 — β -конфигурация, расположение гидроксильных групп при C_1 , C_2 и C_3 соответствует α , e , α . Ион кальция находится между двумя молекулами сахара и координируется с O_1 , O_2 и O_3 одной молекулы и O_4 и O_5 другой молекулы, а также с тремя молекулами воды. Таким образом, каждый ион кальция координируется с восемью атомами кислорода.

Хроматография моносахаридов. Для обнаружения, разделения и идентификации углеводов применяют различные хроматографические методы. В предыдущие годы чаще других использовали метод бумажной хроматографии. В процессе хроматографирования происходит распределение вещества между стационарной жидкой фазой (вода на бумаге) и подвижной органической фазой. Значение R_f^* зависит от растворимости в подвижной органической фазе моносахарида в стабильной конформации, что, в свою очередь, определяется степенью гидратации гидроксильных групп. Известно, что экваториальные гидроксильные группы гидратируются легче, чем аксиальные, которые пространственно более затруднены. Вследствие этого увеличение числа экваториальных групп уменьшает растворимость вещества в органиче-

* R_f — отношение расстояния, пройденного веществом, к расстоянию, пройденному растворителем на хроматограмме. В стандартных условиях эта величина постоянна.

ской фазе и понижает R_f , в то время как увеличение числа аксиальных гидроксильных групп увеличивает растворимость в органическом растворителе и соответственно повышает R_f . Данные R_f некоторых моносахаридов в системе этилацетат — пиридин — вода (2 : 1 : 2) приведены ниже [23]:

	Число и положение аксиальных гидроксильных групп*	R_f
<i>D</i> -Рибоза	1 [C ₃ (C ₂ или C ₄)]	0,33
β - <i>D</i> -Манноза	1 (C ₂)	0,24
β - <i>D</i> -Галактоза	1 (C ₄)	0,175
β - <i>D</i> -Глюкоза	0	0,135
Метил- <i>D</i> -галактопиранозид . .	1 (C ₄)	0,34
Метил- <i>D</i> -галактофуранозид . .	1 (C ₄)	0,47

* Гидроксильные группы при C₁ не учитываются.

Подвижность уменьшается с увеличением молекулярной массы и увеличивается с отщеплением или замещением гидроксильных групп.

Разделительная способность бумажной хроматографии возрастает при использовании веществ, образующих комплексы с моносахаридами (борная и фенилборная кислоты).

Обнаружение вещества на хроматограмме проводится обычно нитратом серебра и щелочью (0,1 н. AgNO₃ в 5 н. водном NH₄OH, 100—105 °C). Применение специфических реагентов для обнаружения вещества на хроматограмме дает дополнительную информацию о его структуре [33]. Например, восстанавливающие моносахариды обнаруживаются 3,4-динитробензойной кислотой, анилином или трифенилтетразолийхлоридом, а невосстанавливающие — периодат-купратом калия. Гликольная группировка определяется при действии периодатов и тетраацетата свинца.

В последние годы широко используется тонкослойная хроматография (ТСХ) [34] на пластинках с целлюлозой или силикагелем. Основными ее преимуществами являются быстрота анализа и возможность выделения чистых веществ в препаративных количествах. Использование двумерной хроматографии позволяет увеличить разделительную способность и, таким образом, анализировать сложные смеси моносахаридов.

Для выделения и очистки моносахаридов широко используется хроматография на колонках с целлюлозой, углем, силикагелем, окисью алюминия и различными ионообменными смолами. Применение того или иного адсорбента определяется свойствами разделяемых моносахаридов.

Для анализа моносахаридов используют также газо-жидкостную хроматографию [35]. В этом случае моносахариды предварительно превращают в триметилсилильные или метиловые эфиры или ацетаты и трифторацетаты. Необходимо, однако, отметить, что при получении триметилсилильных производных возможна мутаротация, вследствие чего число пиков на хроматограмме увеличивается.

Очень удобен для анализа моносахаридов метод ГЖХ в сочетании с масс-спектрометрией.

Электрофорез на бумаге. Этот метод позволяет разделять моносахариды, которые не удастся разделить на бумажной хроматограмме, например α - и β -глюкопиранозиды. При разделении нейтральных моносахаридов часто используют их способность образовывать комплек-

сы с борной кислотой, ее солями и производными и другими неорганическими ионами. На разделительную способность в этом методе существенно влияет рН раствора.

Типичные представители моносахаридов, входящих в состав полисахаридов и углевод-белковых комплексов

Моносахариды представлены в структуре полисахаридов и углевод-белковых комплексов альдогексозами, дезоксисахарами, аминсахарами, уроновыми и сиаловыми кислотами.

Альдозы. Наиболее важными представителями альдоз являются альдогексозы *D*-глюкоза, *D*-галактоза и *D*-манноза (табл. 3).

D-Глюкоза имеет исключительное значение для жизнедеятельности животных и растительных организмов. Она служит основным энергетическим материалом для живой клетки. *D*-Глюкоза широко распространена в природе как в свободном, так и в связанном состоянии. Она входит в состав олигосахаридов, полисахаридов и углевод-белковых комплексов.

Вторым по распространенности в природе моносахаридом является галактоза. *D*-Галактоза в свободном состоянии почти не встречается, лишь в незначительной концентрации присутствует в крови и моче, но широко представлена в структуре олигосахаридов, полисахаридов и углевод-белковых комплексов. В некоторых полисахаридах обнаружена *L*-галактоза (галактан улитки, агар-агар водорослей).

D-Манноза входит главным образом в структуру полисахаридов и гликопротеидов.

В клетках растений часто встречается *D*-ксилоза — представитель альдопентоз. Основным источником *D*-ксилозы служит гидролизат древесины. В растительных полисахаридах находится также *L*-арабиноза, для которой характерна фуранозная форма.

Дезоксисахара. Моносахариды, в которых одна или несколько гидроксильных групп замещены атомами водорода, называются дезокси-сахарами. Наиболее важным представителем этой группы моносахаридов являются фукоза (6-дезоксигалактоза).

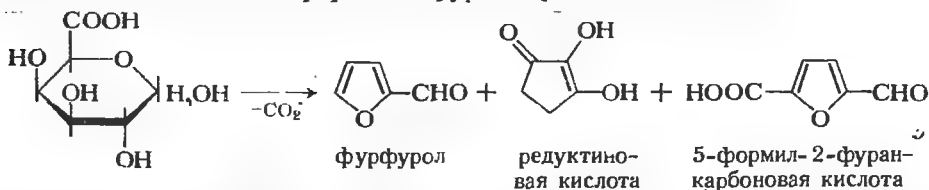
В природных олигосахаридах, полисахаридах и углевод-белковых комплексах обычно присутствует *L*-фукоза, в бактериальных полисахаридах и гликопротеидах — *L*-рамноза (6-дезоксид-*L*-манноза).

Аминосакхара. В углевод-белковых комплексах наиболее часто содержатся 2-амино-2-дезоксисахара и их ацетильные производные. Аминосакхара наряду с обычными свойствами моносахаридов проявляют особенности в поведении, которые обусловлены присутствием аминогруппы, — обладают основными свойствами, легко образуют соли с кислотами. Аминогруппа сахаров легко алкилируется и ацилируется и взаимодействует с альдегидами с образованием шиффовых оснований. Для получения гликозидов аминсахаров требуется предварительная защита аминогруппы, например с помощью ацетилирования. Гликозиды аминсахаров в отличие от обычных гликозидов более стабильны в условиях кислотного гидролиза. Аминосакхара могут претерпевать перегруппировку Лобри де Брюина — Альберда ван Экенштейна. α -Аминогликольная группировка в аминсахарах окисляется иодной кислотой аналогично α -гликольной группировке в альдозах, но устойчива в случае замещенной аминогруппы.

Уроновые кислоты. В природе широко распространены уроновые кислоты, возникающие в результате окисления первичной гидроксильной группы моносахаридов. Наличие в уроновых кислотах карбоксильной группы определяет их кислотные свойства. Они отличаются от сахаров других типов по электрофоретической подвижности и хроматографическим свойствам.

Наиболее важными представителями уроновых кислот являются *D*-глюкуроновая, *D*-галактуроновая и *D*-маннуриновая кислоты.

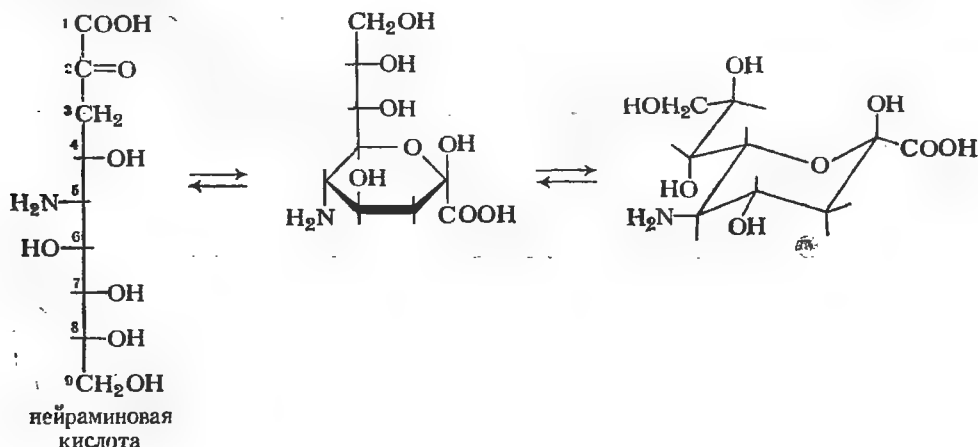
Уроновые кислоты в присутствии щелочи легко претерпевают перегруппировку Лобри де Брюина — Альберда ван Экенштейна, а также эпимеризацию по C_5 . Под действием сильных кислот происходит декарбоксилирование уроновых кислот с образованием фурфуrolа, редутиновой кислоты и 5-формил-2-фуранкарбоновой кислоты:



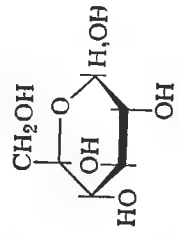
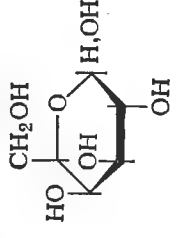
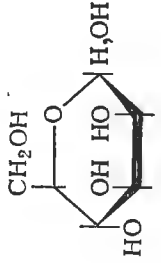
Сиаловые кислоты. Особое место в группе моносахаридов занимает нейраминная кислота и ее производные — сиаловые кислоты. В связанном состоянии они находятся во всех тканях животного организма, а в свободном состоянии обнаружены в спинномозговой жидкости и слизистой желудка.

Сиаловые кислоты представляют собой бесцветные кристаллические вещества, не имеющие резкой температуры плавления (разлагаются при 130—200 °C). Они хорошо растворимы в воде и нерастворимы в неполярных растворителях. Почти все сиаловые кислоты левовращающие, $[\alpha]_D^{22} -32^\circ$ (H_2O). В водных растворах не удается наблюдать мутаротации, но она отчетливо проявляется в растворах диметилсульфоксида: -115° (7 мин) $\rightarrow -37^\circ$ (23 мин) $\rightarrow 24^\circ$.

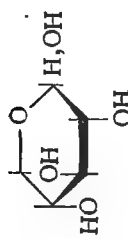
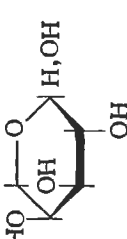
Термин сиаловые кислоты является групповым названием различных *N*- и *N,O*-ацилированных (или *O*-метилированных) производных нейраминной кислоты или 2-кето-3,5-дидезокси-5-амино-*D*-глицеро-*D*-галакто-ноновой кислоты. Последняя может существовать в ациклической или циклической форме с предпочтительной конформацией кресла:



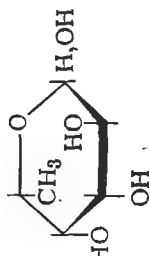
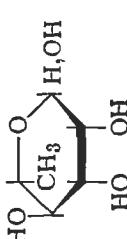
Т а б л и ц а 3. Структура и физико-химические свойства некоторых моносахаридов

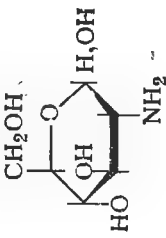
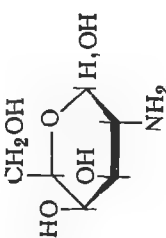
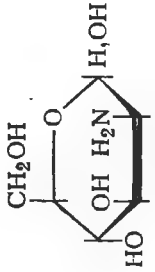
Моносахарид	Сокращенное название	Формула	Предпочтительная конформация	Т. пл., °С	$[\alpha]_D^{20}(\text{H}_2\text{O})$	Нахождение в природе
Альдогексозы						
<i>D</i> -Глюкоза α - β -	<i>D</i> -Glc		4C_1	146—147 (моно-гидрат) 83 148—150	+113→+52,7 +102→+47,8 +18,7→+52,7	Целлюлоза, крахмал, гликоген, декстран, лактоза
<i>D</i> -Галактоза α - β -	<i>D</i> -Gal		4C_1	165—167 167	+150→+80,2 +52→+80,2	Гликопротеины плазмы крови, эритроцитов, желудочного сока, мочи, олигосахариды молока, гликолипиды, ганглиозиды
<i>D</i> -Манноза α - β -	<i>D</i> -Man		4C_1	133 132	+34→+14,2 —17→+14,2	Маннаны, галактоманнаны, гликопротеины плазмы крови, гликолипиды

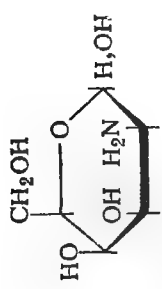
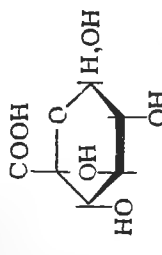
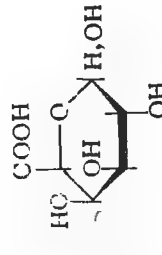
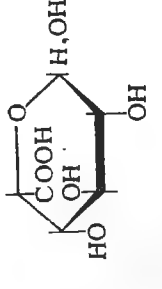
Альдопентозы

D-Ксилоза, α-	D-Xyl		⁴ C ₁	145	+93,6→+18,8	Ксиланы, арабосиланы
L-Арабиноза α- β-	L-Ara		⁴ C ₁	160 —	+190,6→+104,5 +77	Арабаны, бактериальные поли-сахариды

Дезоксисахара

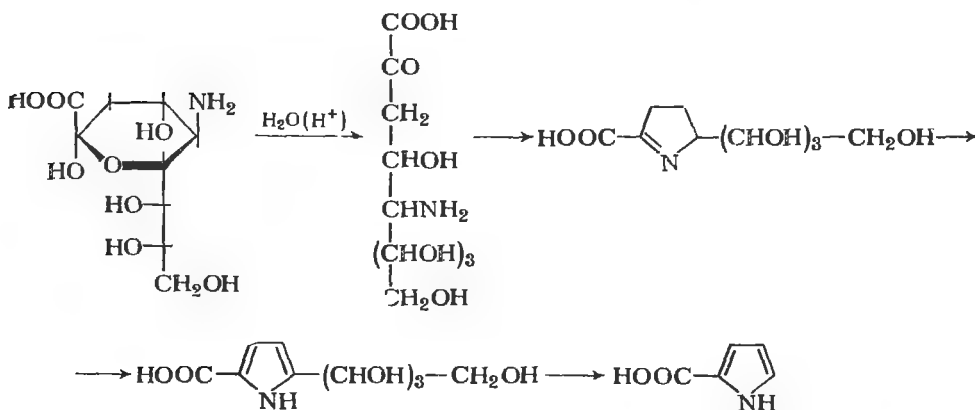
L-Фукоза	L-Fuc		¹ C ₄	145 (140—141)	—124,1→—76,4 (—75,02)	Олигосахариды молока, группоспецифические вещества крови, полисахариды водорослей и бактерий
L-Рамноза α- β-	L-Rha		¹ C ₄	93—94 124	+9,1 +38,4→+8,9	Полисахариды и гликопротеины бактерий

Моносахарид	Сокращенное название	Формула	Предпочтительная конформация	Т. пл., °C	$[\alpha]_D^{20}(\text{H}_2\text{O})$	Нахождение в природе
Аминосакхара						
<i>D</i> -Глюкозамин α- β-	<i>D</i> -GlcN		⁴ C ₁	88 120	+100→+47,5 +14→+47,6	Олигосахариды молока, хитин насекомых, полисахариды соединительной ткани, группспецифические вещества крови, гликопротеины плазмы крови
<i>D</i> -Галактозамин α- β-	<i>D</i> -GalN		⁴ C ₁	178—180	+135→+93 —	Хондроитинсульфат, гликопротеины плазмы крови
<i>D</i> -Маннозамин	<i>D</i> -ManN		⁴ C ₁	178—180	—3	Сиаловые кислоты гликопротеинов

<i>D</i> -Талозамин		⁴ C ₁	151—153	+3→5,7	Хондроитинсерные кислоты
Уроновые кислоты					
<i>D</i> -Глюкуроновая		⁴ C ₁	153	+11,7→+36,3	Полисахариды соединительной ткани, глюкоурониды
<i>D</i> -Галактуроновая α-β		⁴ C ₁	159 166	+97→+50,9 +2,7→+55,6	Полисахариды и пектины растений
<i>L</i> -Идуоновая		¹ C ₄	131—132	+37→+33	β-Гепарин, хондроитинсульфат В

Полифункциональность этих соединений позволяет отнести их в равной степени к кетозам, аминосахарам, дезоксисахарам и аминокислотам. Сиаловые кислоты проявляют свойства сильных кислот и подобно другим α -кетокислотам характеризуются низкими значениями pK_a (2,6—2,8). Они вносят существенный вклад в поверхностный заряд молекул гликопротеинов и определяют их поведение при электрофорезе, ионообменной хроматографии, устойчивость к действию протеолитических ферментов, иммунохимические свойства.

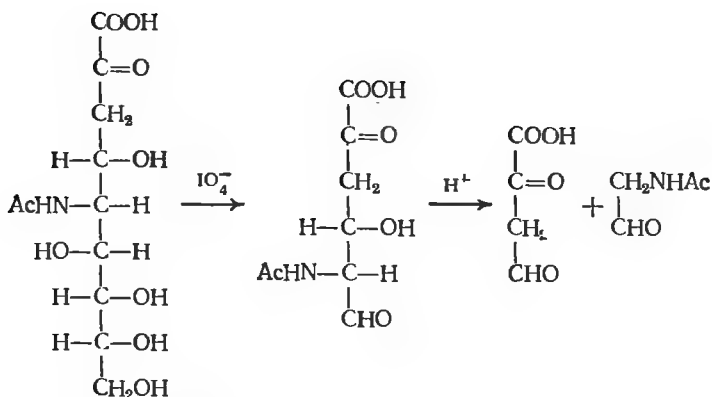
Кетозидная связь сиаловых кислот легко подвергается гидролитическому расщеплению, что обусловливается влиянием карбоксильной группы. Под действием кислот и оснований сиаловые кислоты разлагаются. При длительном воздействии кислот они образуют гумины. Сиаловые кислоты склонны к внутримолекулярным конденсациям:



При периодатном окислении N-ацетилнейраминовой кислоты образуется муравьиная кислота (1 моль) и формальдегид (1 моль), что соответствует пиранозной форме этого моносахарида.

Ферментативный синтез N-ацетилнейраминовой кислоты достигается альдольной конденсацией пировиноградной кислоты и N-ацетил-D-маннозамина с помощью фермента из *Clostridium perfringens* (альдолаза N-ацетилнейраминовой кислоты).

Для определения сиаловых кислот используется ряд реакций. Одной из специфических реакций является прямая реакция Эрлиха. При нагревании сиаловой кислоты ($100^\circ C$) в 1 н. соляной кислоте в присутствии *n*-диметиламинобензальдегида появляется пурпурная окраска, обусловленная, по-видимому, образованием пирролкарбоновой кислоты. Данная реакция широко применяется при исследовании гликопротеинов, так как другие компоненты этих биополимеров в этих условиях не дают окрашенных соединений. Широко используется также реакция Уоррена с тиобарбитуровой кислотой. При этом образующаяся в результате окисления периодатом формилпировиноградная кислота взаимодействует с 2-тиобарбитуровой кислотой и дает окрашенное соединение ($\lambda_{\text{макс}} 549 \text{ нм}$):

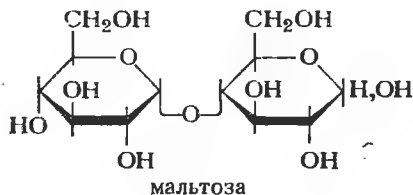
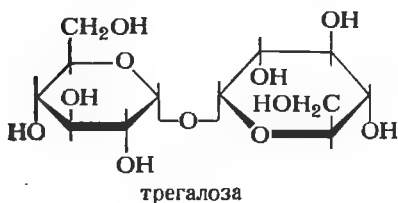


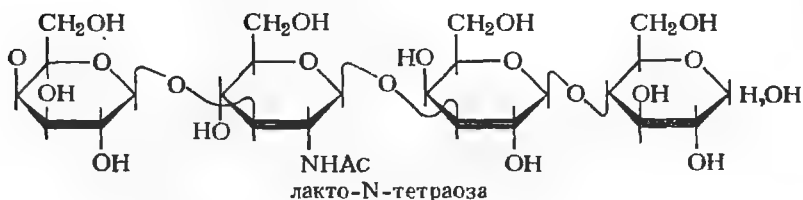
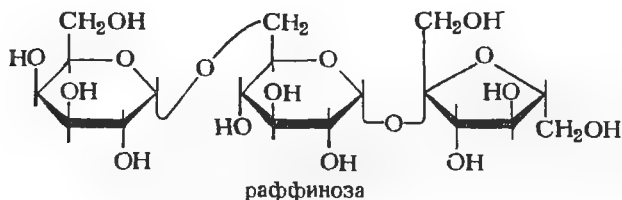
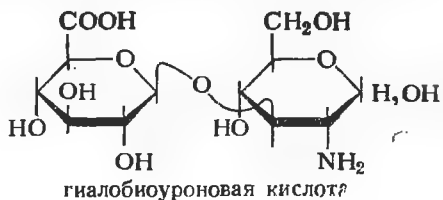
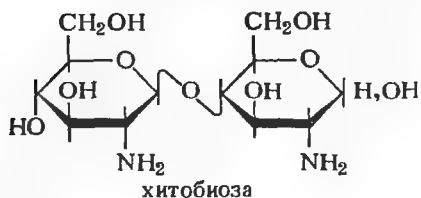
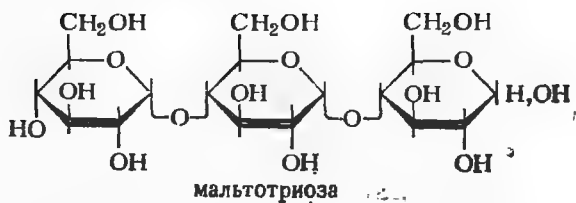
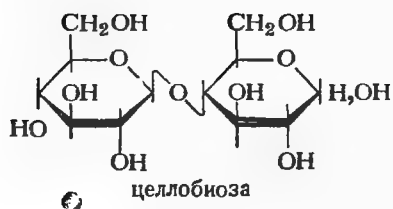
Реакция неприменима для гликозидов и 7-замещенных сиаловых кислот.

ОЛИГОСАХАРИДЫ

Олигосахариды [1; 10, v. 11A; 36] построены из остатков моносахаридов (от двух до десяти), соединенных друг с другом гликозидными связями, которые легко гидролизуются в растворах кислот. В свободной форме олигосахариды широко представлены в растительных клетках и секретах животных. В связанном состоянии, как структурные единицы полисахаридов, они присутствуют в клетках микроорганизмов, водорослей, растений, животных и человека.

Олигосахариды в зависимости от количества присутствующих моносахаридных единиц классифицируются как ди-, три-, тетрасахариды и т. д. Соединение моносахаридных остатков осуществляется при участии либо только полуацетальных гидроксильных групп, либо одного полуацетального и одного спиртового гидроксильных групп. В первом случае образующийся олигосахарид будет относиться к группе невосстанавливающих (трегалоза, раффиноза), поскольку он не сможет проявлять реакций, характерных для альдегидной группы. Во втором случае, напротив, один из моносахаридов, имеющий свободный полуацетальный гидроксил, может присутствовать в открытой форме и проявлять восстанавливающие свойства, в связи с чем олигосахарид будет относиться к группе восстанавливающих (мальтоза, целлобиоза и др.). В образовании восстанавливающих олигосахаридов принимают участие различные спиртовые гидроксильные группы. Олигосахариды обоих типов существуют в α - и β -аномерных формах. Структура олигосахаридов может быть линейной (мальтотриоза) и разветвленной (раффиноза):





Номенклатура олигосахаридов

Некоторые олигосахариды имеют тривиальные названия, например мальтоза, целлобиоза, лактоза и др. Существует также систематическая номенклатура олигосахаридов [38, 39].

Применяются две системы номенклатуры олигосахаридов. В соответствии с первой, восстанавливающие олигосахариды называются гликозилальдозами или -кетозами, а невосстанавливающие — гликозилальдозидами или -кетозидами. Положение и направление гликозидной связи указывается номерами углеродных атомов, у которых произошло замещение. Символами α или β обозначают стереохимию гликозидной связи, D или L — конфигурацию моносахаридных остатков и символом O — замещение у атома кислорода. По данной системе мальтоза должна быть названа 4- O - α - D -глюкопиранозил- D -глюкопиранозой, а лактоза — 4- O - β - D -галактопиранозил- D -глюкопиранозой. Невосстанавливающий сахар трегалоза называют 1- O - α - D -глюкопиранозил- α - D -глюкопиранозидом. При увеличении числа моносахаридных остатков в олигосахариде гликозидную связь обозначают двумя цифрами и стрелкой между ними. Например, мальтотриоза обозначается как O - α - D -глюкопиранозил-(1 $\rightarrow$ 4)- O - α - D -глюкопиранозил-

(1→4)-*D*-глюкопираноза. Учитывая сложность подобных названий, рекомендуется сокращенная форма записи [39], согласно которой моносахаридные остатки обозначаются тремя первыми латинскими буквами их названия (для глюкозы — Glc) (см. стр. 42), после этого указывается форма моносахарида (пиранозная — p, фуранозная — f). Мальтоза в соответствии с этой формой записи будет обозначаться как 4-*O*- α -*D*-Glc-p-*D*-Glc-p, а мальтотриоза как *O*- α -*D*-Glc-p-(1→4)- α -*D*-Glc-p-(1→4)-*D*-Glc-p.

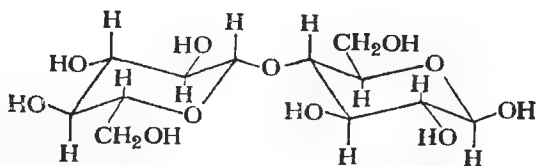
Вторая система номенклатуры подобна номенклатуре углеводов. Название олигосахарида составляется из названий линейных сегментов, причем для обозначения последних используются тривиальные названия. Замещение у специфического остатка обозначается соответствующим номером, индексом (сверху) показывается остаток моносахарида, содержащий замещающую группу, причем номер 1 приоивается восстанавливающей остатку. В соответствии с этой системой номенклатуры мальтотриоза может быть названа как 4²- α -*D*-глюкопиранозилмальтоза или 4-*O*- α -мальтозил-*D*-глюкоза (4² означает, что замещение произошло у C₄ второго гликозильного остатка мальтозы).

Структура олигосахаридов

Основные положения, касающиеся структуры моносахаридов, справедливы и для олигосахаридов. В природных олигосахаридах встречаются оба типа гликозидных связей (α - и β -).

Наиболее полно изучена пространственная структура целлобиозы и мальтозы [40] — двух простейших природных дисахаридов, построенных из остатков глюкозы и отличающихся конфигурацией гликозидной связи.

На основании данных рентгеноструктурного анализа [41] для целлобиозы предложена структура, в которой оба остатка глюкозы имеют конформацию ⁴C₁ с экваториальным расположением полуацетального гидроксила:



В мальтозе восстанавливающий остаток глюкозы также имеет конформацию ⁴C₁, а невосстанавливающий существует в виде скошенных конформаций за счет наличия α -1,4-гликозидной связи.

Свойства олигосахаридов

Олигосахариды представляют собой твердые вещества или сиропы. Многие олигосахариды хорошо растворимы в воде, однако с увеличением молекулярного веса растворимость в воде резко уменьшается. Так же, как и моносахариды, они трудно кристаллизуются. Наиболее употребительные растворители для кристаллизации — это вода, низшие спирты и уксусная кислота. Восстанавливающие олигосахариды проявляют мутаротацию.

При действии кислот олигосахариды расщепляются на моносахариды. В присутствии щелочей они легко изомеризуются, причем наиболее чувствительно восстанавливающее звено. Гликозидные связи олигосахаридов разрываются также ферментами. Специфические гликозидазы с высокой степенью специфичности расщепляют определенные типы связей, что широко используется для определения конфигурации гликозидной связи. Например, мальтаза расщепляет только α -гликозидные связи мальтозы и не действует на целлобиозу.

Синтез олигосахаридов

Для получения олигосахаридов используются: химический синтез, биосинтез и расщепление полисахаридов.

Олигосахариды могут быть получены из моносахаридов путем создания гликозидной связи или модификацией олигосахаридов.

Методы создания гликозидной связи

Синтез олигосахаридов из моносахаридов связан с решением двух задач: избирательной защиты гидроксильных групп и создания гликозидной связи.

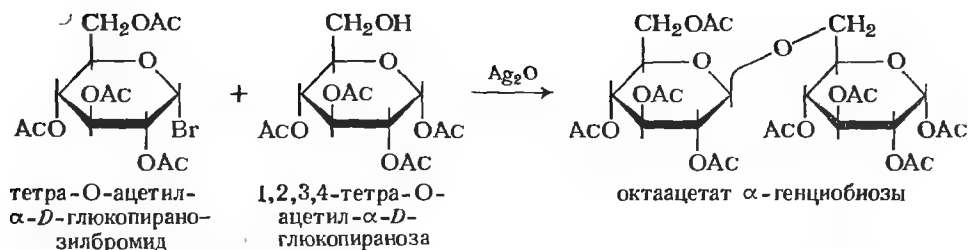
Выбор защитных групп определяется следующими основными требованиями: защитные группы должны быть инертны в процессе создания гликозидной связи и удаляться без разрушения этой связи. В химии углеводов наиболее часто используются ацетильная, бензоильная, тозилъная, тритильная, бензильная, изопропилиденовая, бензилиденовая и циклокарбонатная защиты. Первичный гидроксил избирательно защищается тритилированием. Изопропилиденовая, бензилиденовая и циклокарбонатная защита блокируют одновременно два соседних гидроксильных. Защита полуацетального гидроксильного достигается получением метил- или бензилгликозидов. Используется также прием защиты всех гидроксильных и последующего избирательного удаления одной из защитных групп. Таким образом из ацилгалогенозов получают производные со свободным полуацетальным гидроксильным.

Существует несколько методов создания гликозидной связи.

Метод Кенигса—Кнорра. Реакция Кенигса—Кнорра заключается во взаимодействии ацилгликозилгалогенида (обычно ацилгликозилбромид) с защищенным моносахаридом, имеющим одну свободную гидроксильную группу. В качестве акцепторов галогеноводорода применяют карбонат серебра или его окись, ацетат или цианид ртути (модификация Земплена и Гельфериха), перхлорат серебра (модификация Бредерика); для связывания воды — прокаленный сульфат кальция (драйерит).

Направление реакции Кенигса—Кнорра зависит от строения ацилгалогенозов, особенно от относительной конфигурации при атомах C_1 и C_2 .

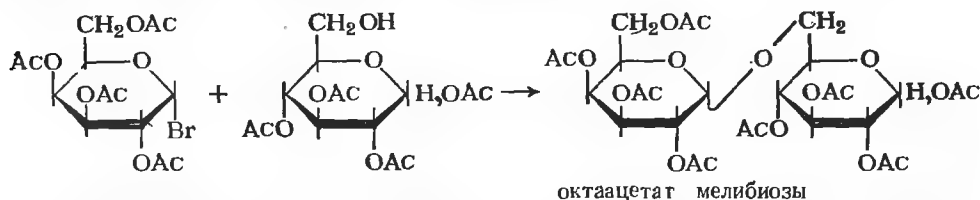
Реакция 1,2-*цис*-ацилгалогенозов сопровождается вальденовским обращением и приводит к олигосахаридам с 1,2-*транс*-гликозидными связями. Конденсация протекает по бимолекулярному механизму S_N2 . Таким образом из тетра-О-ацетил- α -D-глюкопиранозилбромида и 1,2,3,4-тетра-О-ацетил- α -D-глюкопиранозы получен октаацетат α -генциобиозы:



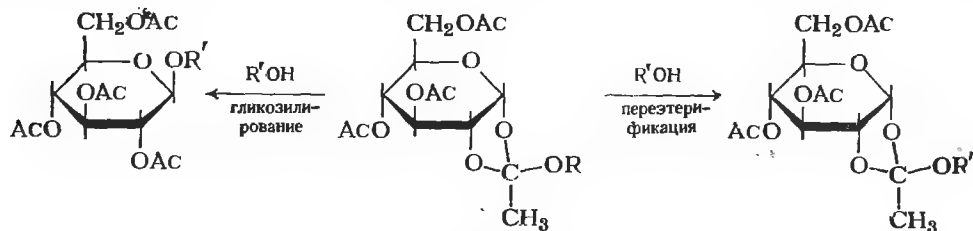
В случае 1,2-*транс*-ацилгалогеноз реакция может протекать как с обращением конфигурации с образованием олигосахарида с 1,2-*цис*-гликозидной связью, так и без обращения конфигурации в результате эффекта «соучастия» ацетильной группы при C₂ (механизм реакции см. стр. 28).

Соотношение образующихся продуктов конденсации зависит от условий реакции — полярности растворителя и температуры. Выход 1,2-*цис*-олигосахаридов обычно невелик и реакцию Кенигса — Кнорра рассматривают как метод получения 1,2-*транс*-олигосахаридов. Гликозилирование легче протекает по первичному гидроксилу и труднее по вторичным. Олигосахариды получают с выходами 40—60%, иногда до 80%.

Синтез олигосахаридов с α -гликозидной связью удается осуществить, используя в качестве акцепторов галогеноводорода соли ртути, пиридин и другие органические основания. Примером может служить синтез октаацетата 6-О- α -D-галактопиранозил-D-глюкозы (мелибиозы) из тетра-О-ацетил- α -D-галактопиранозилбромида и 1,2,3,4-тетра-О-ацетил-D-глюкозы в присутствии хинолина:



Ортоэфирный метод. Ортоэфиры моносахаридов при взаимодействии со спиртами подвергаются перэтерификации или гликозилированию:

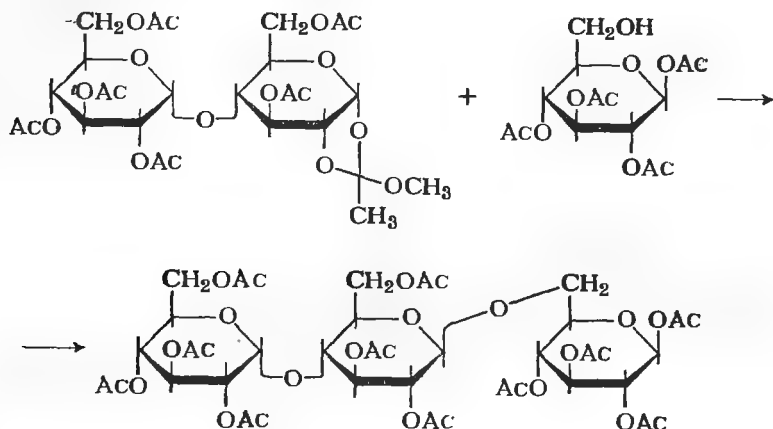


В определенных условиях процесс гликозилирования может стать преобладающим, и в этом случае он используется как метод получения олигосахаридов.

В малополярных растворителях в присутствии катализаторов (*n*-толуолсульфокислота, бромная ртуть, перхлораты органических ос-

нований) протекает переэтерификация ортоэфиров. В среде нитрометана направление процесса зависит от количества катализатора (бромной ртути): в присутствии 0,001 моль катализатора (на 1 моль ортоэфира) идет переэтерификация, при использовании 0,02—0,1 моль катализатора преобладает процесс гликозилирования, приводящий к образованию 1,2-*транс*-гликозидов [42].

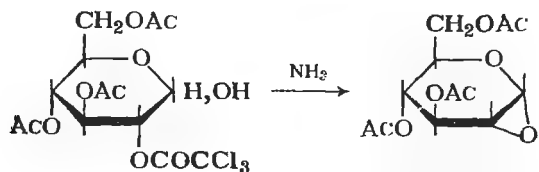
Таким методом получен трисахарид — ундекаацетат 6-О-(β-мальтозил)-β-*D*-глюкопиранозы из ортоэфира защищенной мальтозы и 1,2,3,4-тетра-О-ацетил-β-*D*-глюкозы:



Метод получения олигосахаридов через ортоэфиры дает более высокие выходы, чем реакция Кенигса—Кнорра. Он позволяет получать соединения, содержащие гликофуранозидные связи, синтез которых другими методами осложнен. Ортоэфирный метод рассматривается в настоящее время как наиболее перспективный метод синтеза олигосахаридов.

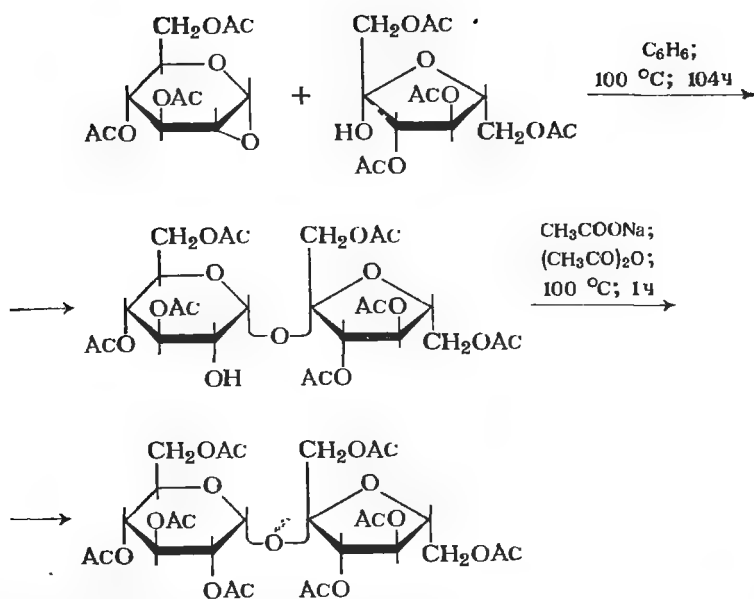
Метод с использованием ангидросахаров. Для синтеза олигосахаридов используют также ангидросахара. Например, 3,4,6-три-О-ацетил-1,2-ангидроглюкоза («ангидрид Бригля») легко образует гликозидную связь с моносахаридами.

Ангидрид Бригля получают действием аммиака на 2-О-трихлор-ацетил-3,4,6-три-О-ацетилглюкозу:



ангидрид Бригля

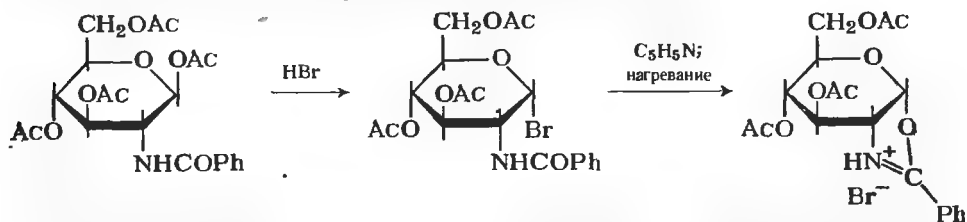
Этим методом синтезированы мальтоза, сахароза, трегалоза и другие олигосахариды с α-гликозидными связями. Конденсацией ангидрида Бригля с 1,3,4,6-тетра-О-ацетил-β-*D*-глюкофуранозой с последующим ацетилированием получена окта-О-ацетилсахароза:



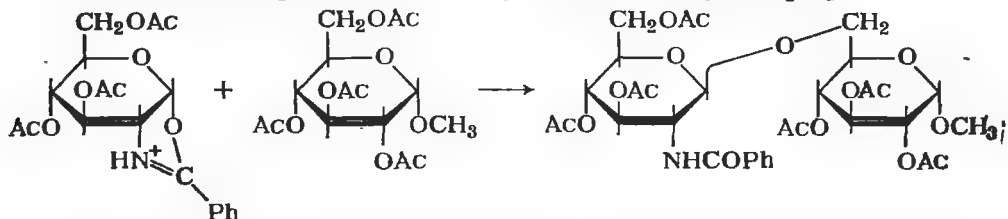
Данный метод приводит преимущественно к 1,2-*цис*-олигосахаридам, однако выходы их обычно малы, и нередко получается смесь α - и β -эпимерных форм, причем последняя преобладает в случае первичных спиртов.

Оксазолиновый метод. Для синтеза олигосахаридов, содержащих остатки аминосахаров, используется так называемый оксазолиновый метод [43].

Исходным веществом для синтеза производных оксазолина является N-бензоил-1,3,4,6-тетра-О-ацетилглюкозамин:

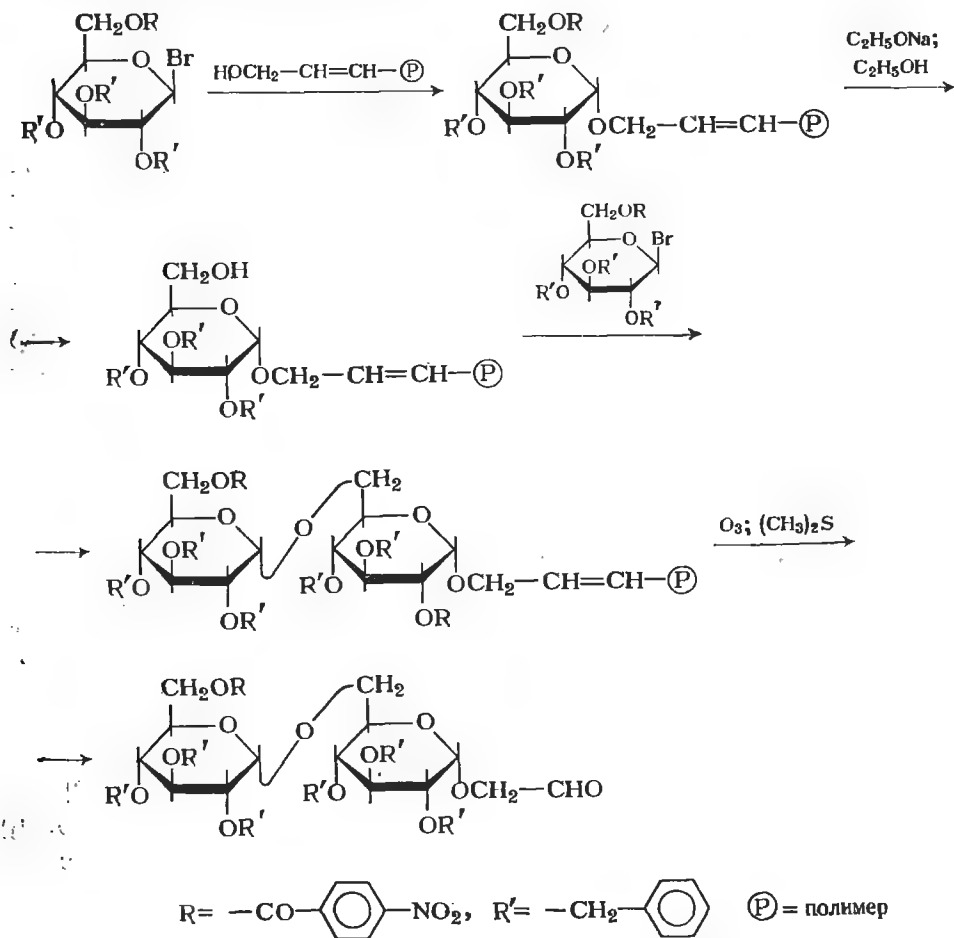


Оксазолиновый цикл легко размыкается при взаимодействии с моносахаридом с образованием 1,2-*транс*-олигосахарида [44]:



Твердофазный синтез олигосахаридов. В последние годы разрабатывается синтез олигосахаридов на полимерной основе [45]. Общие принципы этого метода, рассмотренные при получении пептидов (см. кн. I, с. 129—132), справедливы и для олигосахаридов [46].

В качестве полимера был использован поли-[*п*-(1-оксипропен-3-ил-1)-стирол] — сополимер стирола с дивинилбензолом (1—2%), содержащий около 10% остатков аллилового спирта, на которых осуществляется закрепление первого моносахаридного остатка. Остаток моносахарида должен содержать реакционноспособную группу, обычно бром, в положении 1; один из гидроксиллов, который будет участвовать в образовании гликозидной связи, блокируется легко удаляемой защитной группой, а остальные гидроксилы — стабильными защитными группами. Закрепление моносахарида на смоле проводится в смеси бензола и пиридина при комнатной температуре с использованием примерно четырехкратного мольного избытка моносахарида по отношению к полимеру. В этих условиях реагирует около 90% аллильных спиртовых групп. Затем удаляется одна из защитных групп действием этилата натрия в спирте и проводится конденсация со второй молекулой моносахарида. Отделение олигосахарида от смолы осуществляется окислением озоном:



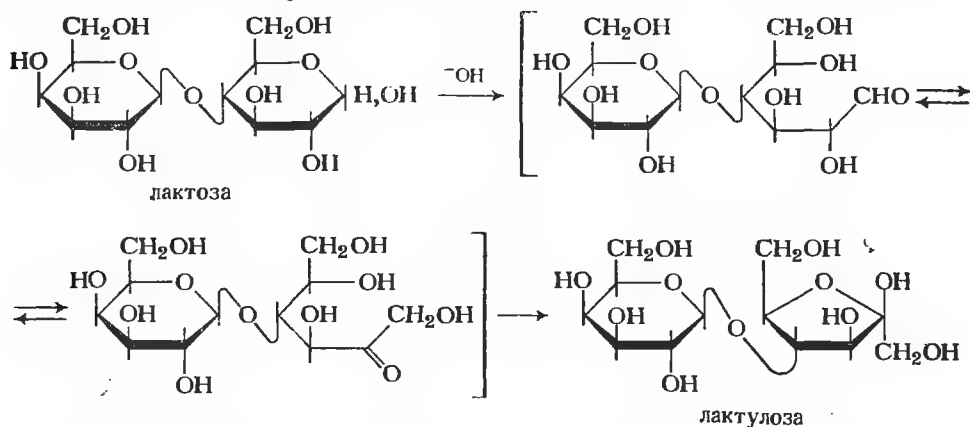
В данной схеме в качестве легко удаляемой группы использовалась *п*-нитробензоильная, а в качестве стабильной — бензильная группа. Выход олигосахарида составил 75%.

Используются и другие защитные группы, например хлорацетильная для защиты гидроксила у C₆ [47], фенолкарбамоильная для защиты аминогруппы [48]. Дальнейшее развитие метода требует разработки методов получения избирательно защищенных моносахаридов и количественного образования гликозидной связи.

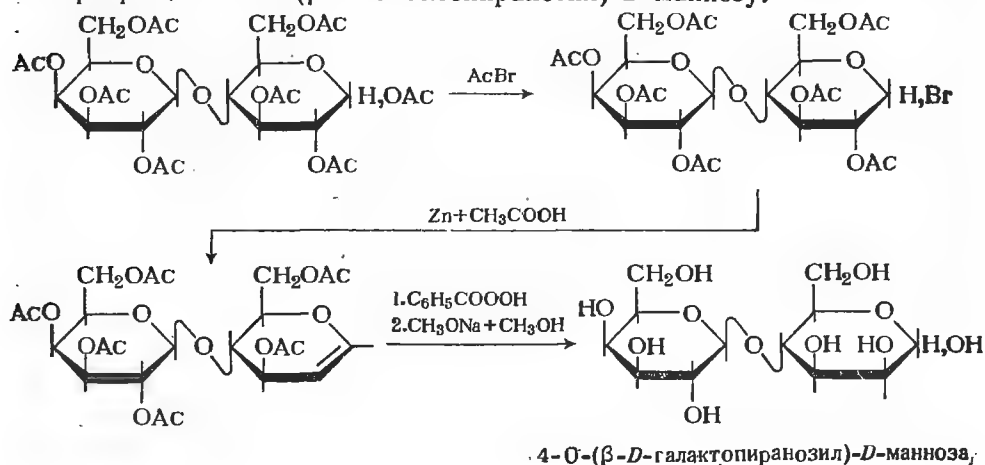
Методы химической модификации олигосахаридов

Синтез олигосахаридов новых типов возможен на основе доступных природных или синтетических олигосахаридов путем модификации восстанавливающего остатка моносахарида (эпимеризация, удлинение или укорочение углеродной цепи и другие превращения) или аномеризацией гликозидной связи. Наиболее типичными являются следующие превращения олигосахаридов.

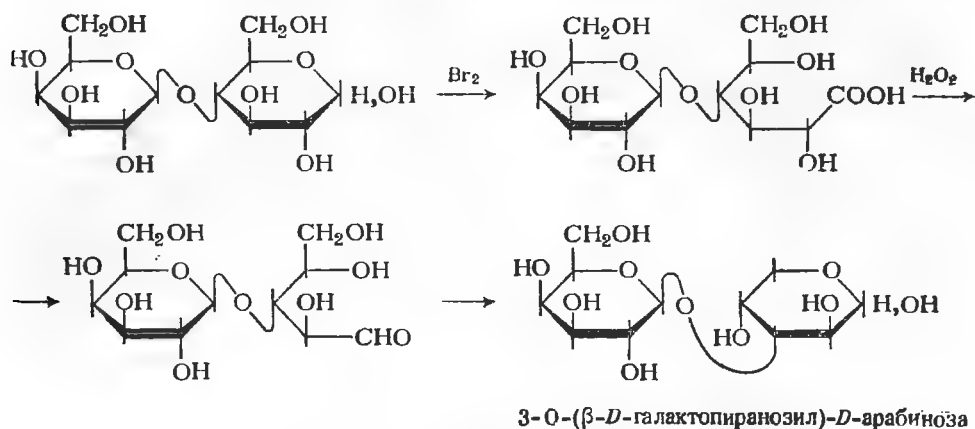
Изомеризация альдоз в кетозы под действием щелочи (перегруппировка Лобри де Брюина—Альберда ван Экенштейна). Примером является синтез лактулозы из лактозы:



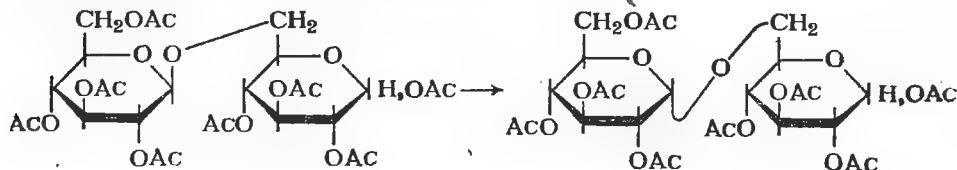
Эпимеризация при C₂ (гликальный метод). Сущность этого метода заключается в превращении ацетобромпроизводного под действием цинка в уксусной кислоте в гликаль, который далее гидроксيليруется с образованием эпимерного соединения. Этим методом октаацетат лактозы превращен в 4-О-(β-D-галактопиранозил)-D-маннозу:



Укорочение углеродной цепи путем окисления восстанавливающего остатка. Иллюстрацией данного метода может служить превращение лактозы в 3-О-(β-D-галактопиранозил)-D-арабопиранозу (деградация по Руффу):



Аномеризация гликозидной связи под действием хлорида олова и четыреххлористого титана. Метод применен для изомеризации октаацетата генциобиозы в октаацетат изомальтозы:



Ферментативный синтез олигосахаридов

Биосинтез олигосахаридов осуществляется в клетке путем трансгликозилирования при помощи ферментов (трансгликозилазы). В этом процессе донорами гликозильных остатков могут быть фосфаты и нуклеотиды сахаров и олигосахариды, а акцепторами — гидроксилсодержащие соединения. Трансгликозилазы проявляют специфичность к донорам с гликозидными связями определенной конфигурации и осуществляют перенос гликозильного остатка с сохранением конфигурации.

При воспроизведении процесса биосинтеза *in vitro* используют ферменты, которые выделяют из клеток микроорганизмов или тканей растительного и животного происхождения. Наиболее богата ферментами печень. Типичными примерами ферментативного синтеза являются синтезы сахарозы и трегалозо-6-фосфата.

Ферментативный синтез сопряжен с рядом трудностей, связанных с выделением ферментов, и в настоящее время имеет ограниченное применение.

Гидролиз высших олигосахаридов или полисахаридов

Получение олигосахаридов путем кислотного или ферментативного гидролиза полисахаридов применяется достаточно широко.

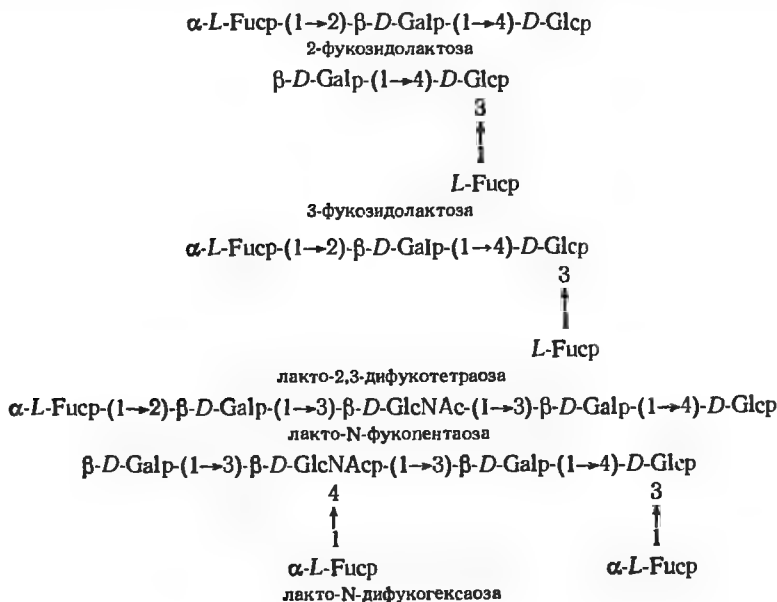
Гидролитические ферменты, расщепляющие гликозидные связи, — гликозидазы (гидролазы) — проявляют высокую специфичность к определенному типу гликозидных связей. По характеру действия они разделяются на *экзо*- и *эндо*-гидролазы. *экзо*-Гидролазы отщепляют однотипные остатки с одного конца полимерной цепи. Например, β -мальтаза превращает амилозу почти количественно в мальтозу. *эндо*-Гидролазы гидролизуют гликозидные связи беспорядочно и дают набор гомологичных серий олигосахаридов. Однако разные типы гликозидных связей расщепляются *эндо*-гидролазами с различной скоростью, что может быть использовано для направленного гидролиза лишь одного типа гликозидных связей. *эндо*-Гидролазы используют для получения олигосахаридов из декстрана.

Кислотный гидролиз полисахаридов осуществляют действием соляной или серной кислот (0,01—2 н.) при повышенной температуре ($\sim 100^\circ\text{C}$). В случае кислотолабильных связей гидролиз может осуществляться и при комнатной температуре. Если все гликозидные связи полисахарида гидролизуются с приблизительно одинаковой скоростью, то получают смесь гомологичных серий олигосахаридов. Кислотный гидролиз используют для получения мальтоолигосахаридов из амилозы, изомальтоолигосахаридов из декстрана и в ряде других случаев.

Отдельные представители олигосахаридов

Наиболее распространенные олигосахариды представлены в табл. 4.

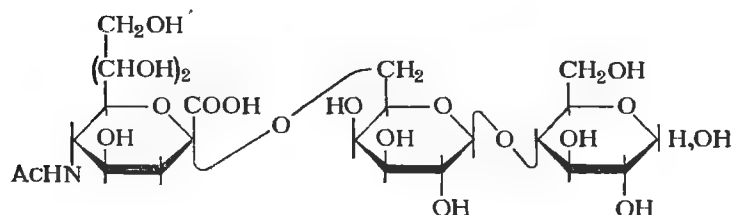
Особенно богато олигосахаридами молоко. Помимо лактозы в коровьем и женском молоке содержится более десяти олигосахаридов. По структуре они разделяются на две группы: фукозо- и сиалосодержащие. Характерной особенностью первой группы является наличие дезоксисахара фукозы, которая присоединена к лактозе или лакто-N-тетраозе. Некоторые олигосахариды молока приведены ниже:



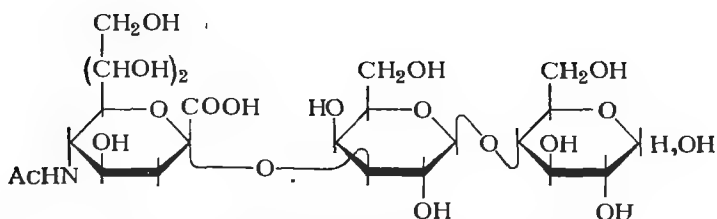
Т а б л и ц а 4. Свойства некоторых олигосахаридов

Олигосахарид		Т. пл., °C	[α] _D (с, Н ₂ O)	Нахождение в природе
тривиальное название	систематическое название			
Сахароза	β-D-Фруктофуранозил-α-D-глюкопиранозид	160—186	+65,53 (26)	Растения (семена, листья, цветы, фрукты, корни)
Лактоза	4-O-(β-Галактопиранозил)-D-глюкопираноза	252	+55,4 (4)	Молоко млекопитающих
		202 (моногидрат)	+52,6 (8)	
Трегалоза	α-D-Глюкопиранозил-α-D-глюкопиранозид	97	+178 (2)	Растения, грибы, дрожжи
Мальтоза	4-O-(α-D-Глюкопиранозил)-D-глюкопираноза	103	+130 (4)	Крахмал (растения), гликоген (животные)
Изомальтоза	6-O-(α-D-Глюкопиранозил)-D-глюкопираноза	Аморф.	+122 (2)	Амилопектин (растения), гликоген (животные), декстрин (бактерии)
Целлобиоза	4-O-(β-D-Глюкопиранозил)-D-глюкопираноза	225	+35 (8)	Целлюлоза (растения)
Хитобиоза	4-O-(2-Амино-2-дезоксид-β-D-глюкопиранозил)-2-амино-2-дезоксид-D-глюкопираноза	247	+18 (1)	Хитин (панцирные животные)
Гиалобиуроновая кислота	3-O-(β-D-Глюкопирануранозил)-2-амино-2-дезоксид-D-глюкопираноза	190	+30 (1)	Гиалуроновая кислота (животные)
Хондрозин	3-O-(β-D-Глюкопирануранозил)-2-амино-2-дезоксид-D-галактопираноза	Аморф.	+42 (2)	Хондронитинсульфаты (животные)
Раффиноза	α-D-Галактопиранозил-(1→6)-α-D-глюкопиранозид-β-D-фруктофуранозид	78 (пентагидрат)	+150 (4)	Сахарная свекла, сахарный тростник

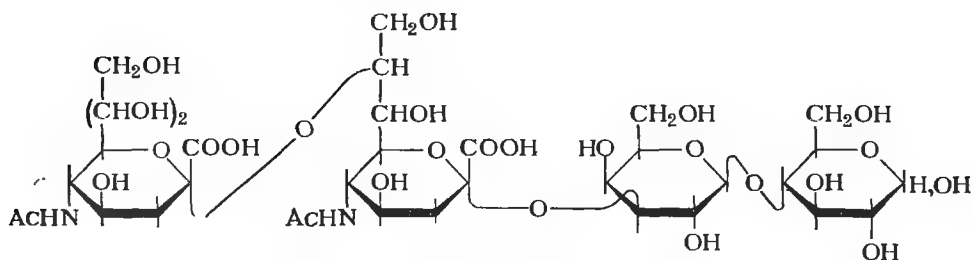
Сиалосодержащие олигосахариды женского молока представлены трисахаридами, пентасахаридами и тетрасахаридами, содержащими остатки сиаловой кислоты. В трисахаридах остаток сиаловой кислоты присоединен к лактозе в положениях 3 или 6 остатка галактозы, в пентасахаридах — к лакто-N-тетраозе в положениях 3 или 6 лактозы и в положении 6 гексозамина:



α-N-ацетилнейрамирил-(2→6)-β-D-галактопиранозил-
-(1→4)-D-глюкопираноза



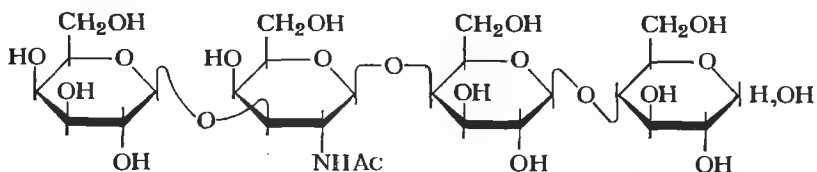
α -N-ацетилнейраминил-(2 $\rightarrow$ 3)- β -D-галакто-
пиранозил-(1 $\rightarrow$ 4)-D-глюкопираноза



дисиаиллактоза

Некоторые из перечисленных олигосахаридов, например лакто-N-тетраоза, оказывают влияние на микрофлору кишечника, и с их присутствием связаны целебные свойства грудного молока. Сиаалосодержащие олигосахариды обладают способностью избирательно реагировать с токсинами столбняка и холеры.

С олигосахаридами молока человека сходны по составу и строению углеводные фрагменты ганглизидов мозга. Сиаловые кислоты в ганглиозидах преимущественно связаны с тетрасахаридами. Одним из таких тетрасахаридов является β -галактопиранозил-(1 $\rightarrow$ 3)- β -D-(N-ацетилгалактозаминил)-(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-галактопиранозил-(1 $\rightarrow$ 4)-D-глюкопираноза:



Сиаловая кислота присоединяется к остаткам галактозы в положения 3 и 6.

ПОЛИСАХАРИДЫ

Полисахаридами называют высокомолекулярные углеводы, которые можно рассматривать как продукты поликонденсации моносахаридов или их производных [1, 37]. Моносахаридные остатки в полисахаридах соединены друг с другом гликозидными связями.

Полисахариды широко распространены в природе и составляют преобладающую массу биополимеров на земле. Молекулы полисахаридов являются составными компонентами всех животных и растительных клеток, а также микроорганизмов. Растения содержат 80—90%

полисахаридов и служат основным источником их получения. Полисахариды разнообразны по своему строению и функциям.

Полисахариды, выполняющие опорную функцию, обеспечивают жесткость клеток или их агрегатов и отличаются стабильностью к кислотному и ферментативному гидролизу из-за наличия β -гликозидной связи. Примерами таких полисахаридов служат целлюлоза — основной полисахарид растений и хитин — полисахарид защитных тканей насекомых и скелета членистоногих.

Внутриклеточные или соматические полисахариды являются энергетическим и структурным материалом клетки. К ним относятся гликоген мышц и крахмал растений. Эти соединения имеют лабильную α -гликозидную связь, легко разрывающуюся при ферментативном и кислотном гидролизе.

Защитную и иммунную роль выполняют полисахариды животных тканей (гепарин, гиалуроновая кислота, хондроитинсульфаты). Они имеют более сложное строение по сравнению с полисахаридами бактериального и растительного происхождения. Характерным отличием этих соединений является наличие нескольких типов моносахаридных остатков и различных типов гликозидных связей.

Первые названия полисахаридов обычно были связаны с источником их выделения (крахмал, целлюлоза, амилоза, амилопектин, хитин, гепарин и др.). В настоящее время создается систематическая номенклатура полисахаридов. Название полисахарида составляется из названия моносахарида с заменой окончания «оза» окончанием «ан» (гликан) [49]. Таким образом, полимер, построенный из остатков *D*-глюкозы, называют *D*-глюканом, из *D*-маннозы — *D*-маннаном, а из *D*-галактозы и *D*-маннозы — *D*-галакто-*D*-манногликаном.

Полисахариды в соответствии с их химическим строением классифицируются на гомогликаны (гомополисахариды) и гетерогликаны (гетерополисахариды). Гомогликаны дают при гидролизе только один моносахарид. К ним относятся крахмал, целлюлоза, хитин и другие. Гетерогликаны гидролизуются с образованием нескольких моносахаридных остатков (от двух до шести). Типичными представителями гетерополисахаридов являются гемицеллюлоза, пектиновые вещества, камеди и слизи растений, полисахариды соединительной ткани.

Полисахариды обычно выделяют в виде твердых аморфных порошков. Они, как правило, растворимы в воде, хуже — в диметилформамиде и диметилсульфоксиде, практически нерастворимы в низших спиртах и неполярных органических растворителях. В растворах молекулы полисахаридов образуют беспорядочно свернутые рыхлые клубки, связывающие большое количество растворителя и легко взаимодействующие друг с другом, вследствие чего наблюдается повышенная вязкость растворов и склонность к образованию гелей. Для характеристики полисахаридов используют единственную физическую константу — удельное вращение.

Полисахариды обычно построены из остатков альдоз. Гликозидные связи образуются за счет гидроксила при C_1 одного моносахаридного остатка и любого другого гидроксила следующего моносахаридного остатка. Многие полисахариды имеют только один тип гликозидной связи и образуют длинные линейные цепи. Например, амилоза имеет только α -(1 $\rightarrow$ 4)-связи, а целлюлоза — β -(1 $\rightarrow$ 4)-связи. Если гликозидные связи различны, может возникнуть разветвленная цепь. Так, амилопектин, имеющий α -(1 $\rightarrow$ 4)- и α -(1 $\rightarrow$ 6)-связи, построен из раз-

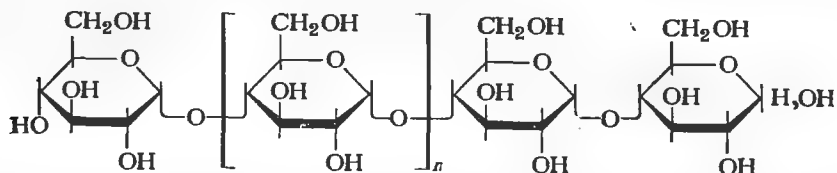
ветвленных цепей моносахаридов; конфигурация при C_1 у большинства таких полисахаридных цепей одинакова. Разветвление цепи возможно и при наличии в молекуле полисахарида различных моносахаридных остатков. При этом в основной цепи обычно расположены гексозы и уроновые кислоты, а в боковых цепях — пентозы.

В молекуле полисахарида в конце цепи обычно находится восстанавливающий остаток сахара, однако в связи с небольшим удельным весом этого остатка по отношению ко всей молекуле восстанавливающие свойства проявляются полисахаридами очень слабо.

Отдельные представители полисахаридов

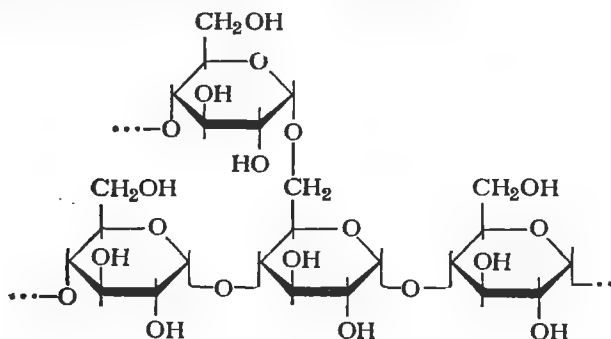
Крахмал. Крахмал является основным резервным углеводом растений и составляет от 30 до 60% сухой массы растительной ткани. Он состоит из двух гомополисахаридов: амилозы и амилопектина, построенных из глюкозы. Их соотношение колеблется в зависимости от источника выделения и составляет 1:6 или 1:3, в отдельных случаях 3:1. Крахмал некоторых растений не содержит амилозы.

Амилоза представляет собой неразветвленный полимер, построенный из остатков *D*-глюкозы, соединенных α -(1 $\rightarrow$ 4)-гликозидными связями (мол. масса около 50 000, $[\alpha]_D + 220^\circ$):



При ферментативном гидролизе амилозы в качестве конечного продукта образуется дисахарид мальтоза. Изучение пространственной структуры амилозы показало, что моносахаридные остатки находятся в конформации 4C_1 . В растворе молекулы амилозы ориентируются в виде изогнутых нитей. Амилоза легко образует комплексы включения с различными соединениями (иод, спирт и др.) путем гидрофобного связывания. На свойстве амилозы образовывать комплексы основано разделение крахмала на составные части. Осаждение комплекса амилозы обычно проводят *n*-бутанолом, из раствора выделяют амилопектин. Содержание амилозы в крахмале составляет $20 \pm 5\%$.

Амилопектин имеет разветвленную структуру. Он также построен из остатков глюкозы. Линейные цепи амилопектина содержат α -(1 $\rightarrow$ 4)-гликозидные связи, в местах разветвления находятся α -(1 $\rightarrow$ 6)-гликозидные связи ($[\alpha]_D + 150^\circ$):

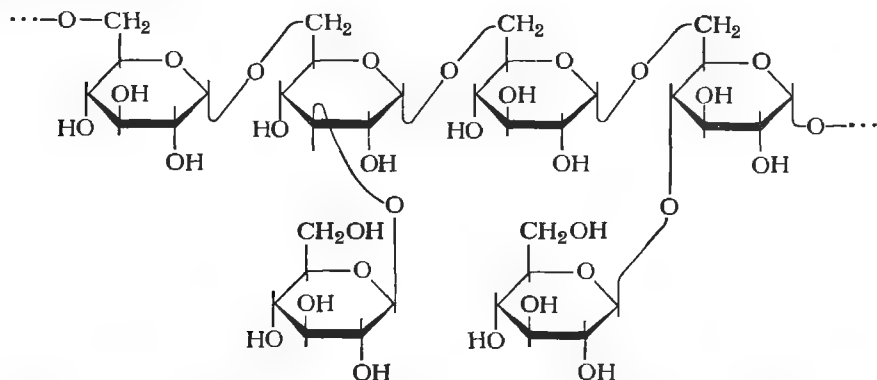


Крахмал применяется в пищевой, текстильной и ряде других отраслей промышленности.

Гликоген. Гликоген (животный крахмал) представляет собой основную резервную форму углеводов животного организма [50]. Он присутствует в значительных количествах в организме взрослого человека, причем главными местами его локализации являются печень и мышечная ткань. Гликоген обнаруживает значительное структурное сходство с амилопектином. Он построен из остатков *D*-глюкозы, содержит α -(1 $\rightarrow$ 4)- и α -(1 $\rightarrow$ 6)-гликозидные связи, но в отличие от амилопектина обладает большей молекулярной массой, большей разветвленностью цепей и более компактной «упаковкой» молекулы. Низкая вязкость растворов гликогена и его седиментационные свойства свидетельствуют о сферической форме молекул. Отмечается способность гликогена к комплексообразованию с белками.

Для здорового организма характерно определенное соотношение свободного и связанного гликогена в клетках. Оно может быть нарушено при ряде заболеваний. Например, при мышечной дистрофии при общем нормальном количестве гликогена наблюдается отсутствие связанного гликогена. При так называемой болезни Гирке происходит накопление гликогена в печени и коре надпочечников. Причиной заболевания является отсутствие одного из ферментов, участвующих в деструкции гликогена, — глюкозо-6-фосфатазы. Другая болезнь — лимит-декстриноз, проявляющаяся в накоплении в печени и мышцах гликогена измененной структуры, вызвана недостатком фермента амилозо-1,6-глюкозидазы.

Декстраны. Декстраны — гомополисахариды, построенные из остатков *D*-глюкозы с доминирующим типом гликозидной связи α -(1 $\rightarrow$ 6), боковые разветвления присоединяются к центральной цепи в положениях 3 и 4 [51]:



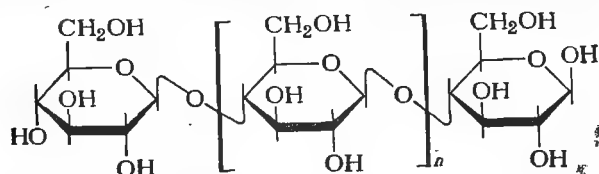
Декстран образуется из сахарозы под действием специфического фермента декстрансахаразы, вырабатываемого бактериями *Leuconostoc misenteroides* и др. В зависимости от применяемого штамма бактерий синтезируются декстраны различной степени разветвленности.

Декстран нашел широкое применение в качестве заменителя плазмы крови [52]. Следует отметить, что декстран, получаемый ферментативным синтезом, не может быть применен для инъекций и поэтому предварительно подвергается расщеплению на фрагменты с молекулярной массой 50 000—70 000 с помощью кислотного гидролиза или действием ультразвука.

Целлюлоза. Целлюлоза является одним из наиболее распространенных растительных гомополисахаридов. Она выполняет роль опорно-

го материала растений: из нее строится жесткий скелет стеблей, листьев. Целлюлоза представляет собой полимер, содержащий 600—9 000 остатков глюкозы, средняя молекулярная масса 100 000—1 500 000.

В молекуле целлюлозы остатки глюкозы соединены β -(1 $\rightarrow$ 4)-гликозидными связями, что определяет линейную структуру полимера:

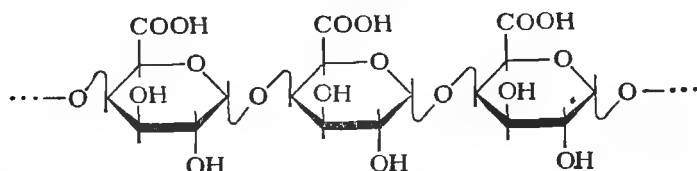


Остатки глюкозы в полимерной цепи целлюлозы имеют конформацию кресла C1.

Неразветвленные цепи целлюлозы пространственно сближены, за счет чего могут возникать различные межмолекулярные взаимодействия. Это обуславливает образование молекулярных агрегатов, содержащих области с высокоупорядоченной кристаллической структурой, которые перемежаются с участками, имеющими аморфный характер.

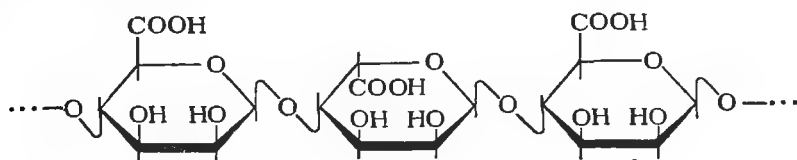
Структурные особенности целлюлозы обеспечивают ее характерные механические свойства и устойчивость к действию ряда химических реагентов, в частности кислот. Целлюлоза, как β -глюкан, не расщепляется обычными ферментами желудочно-кишечного тракта млекопитающих (амилаза и мальтаза), а при действии фермента целлюлазы, выделяемого из кишечной флоры травоядных, распадается на целлодекстрины и целлобиозу.

Полиурониды. Характерными представителями полиуронидов являются пектиновые вещества, содержащиеся в растительных соках и плодах. Пектиновые вещества построены из остатков галактуроновой кислоты, соединенных α -(1 $\rightarrow$ 4)-гликозидными связями:



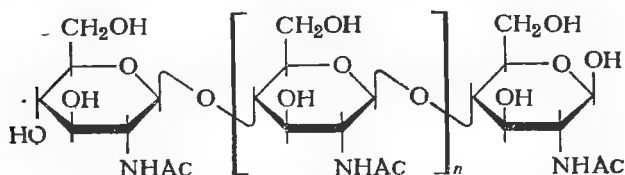
Карбоксильные группировки пектиновых веществ частично метилированы, а частично связаны в виде солей металлов.

По химической структуре к пектиновым веществам примыкает альгиновая кислота, присутствующая во многих бурых водорослях, особенно в видах *Laminaria*. В отличие от пектиновых кислот она является гетерополисахаридом и построена из остатков *D*-маннуровой и *L*-гулуровой кислот, соотношение между которыми колеблется от 0,5 до 3. Моносахаридные остатки связаны между собой β -(1 $\rightarrow$ 4)-гликозидными связями:



Альгиновая кислота находит применение для получения специальных видов волокна и в кондитерской промышленности.

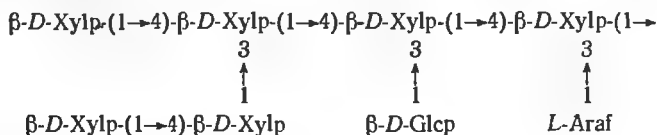
Хитин. Из гомополисахаридов, имеющих в качестве структурной единицы аминсахара, наиболее известен хитин, присутствующий в роговых оболочках насекомых, ракообразных и в некоторых грибах. Хитин построен из остатков N-ацетилглюкозамина, соединенных между собой β -(1 $\rightarrow$ 4)-гликозидными связями:



Пленки хитина, представляющего собой линейный полимер, по прочности не уступают целлюлозным.

Гемицеллюлозы. К ним относят разнообразные по химической структуре гетерополисахариды растений: глюкоманнаны, галактоманнаны и ксиланы, содержащие в боковых цепях арабинозу, глюкозу и т. д. В растениях гемицеллюлозы, как правило, сопутствуют целлюлозе и лигнину, причем ксиланы и глюкоманнаны прочно адсорбируются на поверхности целлюлозы.

Гемицеллюлозы, выделяемые из различных растений, отличаются по структуре. В деревьях и семенах они представлены линейными глюкоманнанами, содержащими остатки β -D-маннозы и β -D-глюкозы, соединенные β -(1 $\rightarrow$ 4)-гликозидными связями. Подобное строение имеет полисахарид эремуран, выделенный из корневищ растений семейства лилейных. В травах и древесине обнаружены гемицеллюлозы, цепи которых построены из остатков ксилопираноз, соединенных β -(1 $\rightarrow$ 4)-гликозидными связями, причем в основной цепи имеются различные разветвления. Ниже приведен фрагмент молекулы гемицеллюлозы из стеблей пшеницы:



БИОСИНТЕЗ И КАТАБОЛИЗМ УГЛЕВОДОВ

Метаболизм углеводов, занимающий центральное место в обмене веществ клетки, состоит из совокупности двух взаимосвязанных процессов: анаболизма (биосинтеза) и катаболизма (распада).

Биосинтез всех углеводов протекает с участием глюкозы и обеспечивается энергией за счет ее распада. Продукты катаболизма глюкозы служат субстратами для анаболических реакций. Особенностью катаболических реакций является то, что они имеют окислительный характер и сопряжены с получением восстановленных форм никотинамид-аденозиндинуклеотидов (НАД-Н и НАДФ-Н) и аденозинтрифосфата (АТФ), который аккумулирует выделяющуюся энергию. Анаболические реакции, напротив, имеют восстановительный характер, и для их протекания необходим расход НАД-Н, НАДФ-Н и АТФ.

Глюкоза получается в растениях под действием солнечного света из двуокиси углерода и воды. Животные организмы не могут таким образом синтезировать глюкозу и получают ее вместе с пищей. Промежуточное соединение в синтезе глюкозы — 3-фосфоглицериновая кислота — является также и продуктом катаболизма глюкозы.

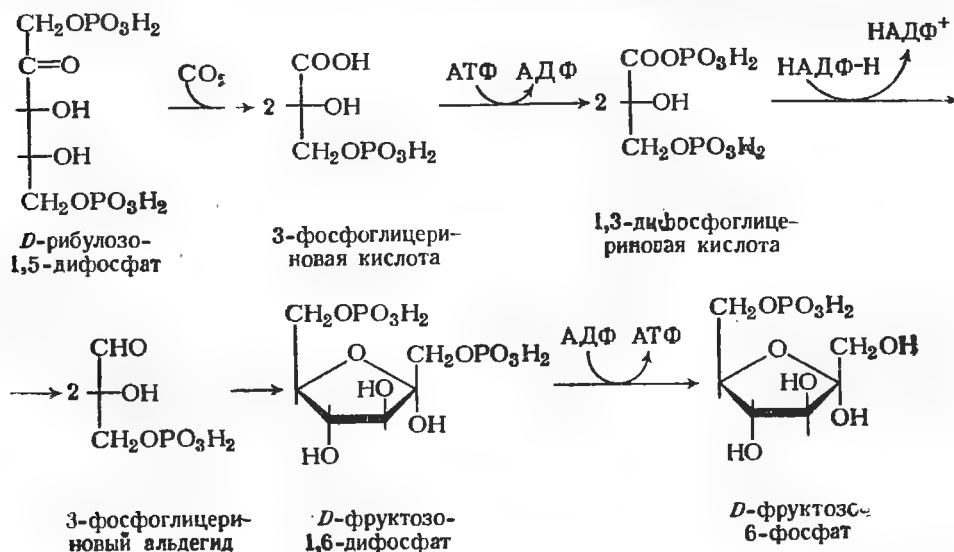
При дальнейшем распаде 3-фосфоглицериновой кислоты получается ацетил-КоА, который поступает в цикл трикарбоновых кислот, где разрушается до CO_2 и H_2O (см. стр. 399).

Биосинтез и катаболизм углеводов подробно рассмотрены в ряде монографий [1, 53—55].

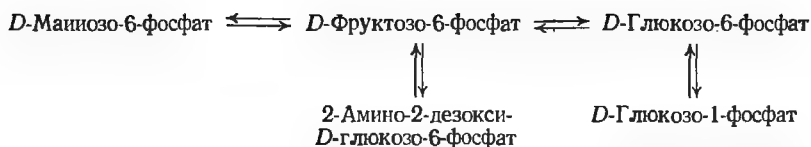
Биосинтез моносахаридов

Моносахариды получают при фотосинтезе путем частичного восстановления двуокиси углерода и последующей конденсации с образованием углерод-углеродной связи.

Субстратом для фиксации CO_2 служит *D*-рибулозо-1,5-дифосфат, реакция катализируется ферментом карбоксидисмутазой. Продукт конденсации расщепляется на две молекулы 3-фосфоглицериновой кислоты, которая фосфорилируется АТФ до 1,3-дифосфоглицериновой кислоты. Восстановление 1,3-дифосфоглицериновой кислоты НАДФ-Н приводит к 3-фосфоглицериновому альдегиду, альдольная конденсация которого с продуктом его изомеризации — диоксиацетонфосфатом — дает *D*-фруктозо-1,6-дифосфат, который дефосфорилируется под действием специфической фосфатазы до *D*-фруктозо-6-фосфата:

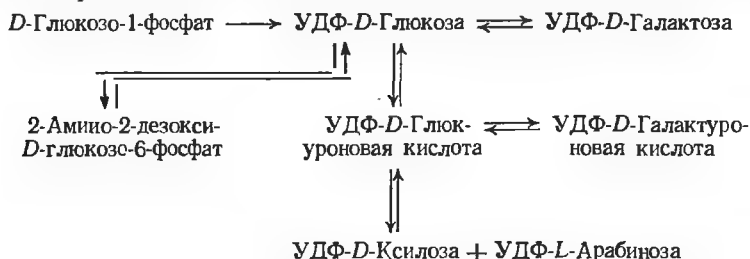


Под действием *D*-глюкозо-6-фосфат-альдокетоизомеразы *D*-фруктозо-6-фосфат изомеризуется в *D*-глюкозо-6-фосфат. Кроме того, *D*-фруктозо-6-фосфат может давать *D*-маннозо-6-фосфат и 2-амино-2-дезоксид-*D*-глюкозо-6-фосфат. *D*-Глюкозо-6-фосфат изомеризуется в α -*D*-глюкозо-1-фосфат под действием фосфоглюкомутазы. Превращения *D*-фруктозо-6-фосфата приведены на следующей схеме:



Другие моносахариды синтезируются на основе фосфатов, полученных из *D*-фруктозо-6-фосфата. Дальнейшие превращения происходят при участии нуклеозиддифосфатов сахаров, которые получаются из фосфатов сахаров и нуклеозидтрифосфатов, причем каждый моносахарид взаимодействует с определенным нуклеозидтрифосфатом. Например, манноза дает ГДФ-производное, нейраминная кислота — УДФ-производное, а глюкоза — УДФ- и ТДФ-производные. Возможно, что существует стереохимическое соответствие между структурой гетероциклического основания и остатка сахара.

УДФ-*D*-Глюкоза в присутствии фермента УДФ-*D*-глюкозо-4-эпимеразы легко эпимеризуется в УДФ-*D*-галактозу, при взаимодействии с *L*-глутамином она дает 2-амино-2-дезоксид-*D*-глюкозо-6-фосфат. Дегидрирование УДФ-*D*-глюкозы, катализируемое УДФ-*D*-глюкозодегидрогеназой, приводит к УДФ-*D*-глюкуроновой кислоте, которая может эпимеризоваться в УДФ-*D*-галактуроновую кислоту или декарбоксилироваться с образованием УДФ-*D*-ксилозы и УДФ-*L*-арабинозы:

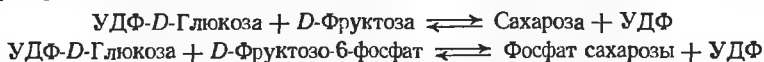


Аналогично получают производные других моносахаридов.

Биосинтез олиго- и полисахаридов

Получение полимерных соединений из моносахаридов сопровождается созданием гликозидных связей. Растительные и животные ткани содержат ферменты — трансгликозилазы, которые осуществляют перенос гликозильных остатков на акцепторы — сахара. При этом образуются более сложные углеводы — сахароза, лактоза, крахмал, гликоген, целлюлоза и другие. Донорами гликозильных остатков служат фосфаты и нуклеотиды сахаров, олигосахариды и полисахариды. Термодинамические данные позволяют считать наилучшими донорами для образования сложных углеводов нуклеозиддифосфаты сахаров, поскольку они имеют высокую отрицательную энергию гидролиза.

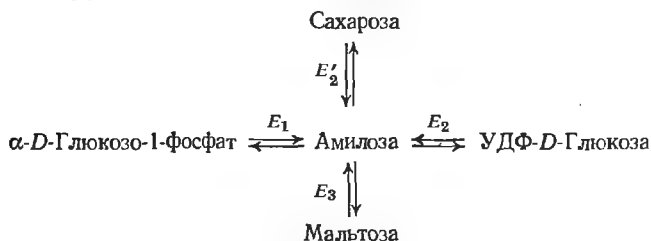
Биосинтез олигосахарида сахарозы осуществляется в растениях путем переноса остатка УДФ-глюкозы на *D*-фруктозу или на *D*-фруктозо-6-фосфат.



Каждая из реакций катализируется своим ферментом: первая — сахарозо-УДФ-глюкозилтрансферазой, вторая — сахарозофосфат-УДФ-глюкозилтрансферазой.

При переносе гликозильного остатка обычно сохраняется конфигурация гликозидного центра. Этот процесс включает двукратное обращение конфигурации: фосфат сахара взаимодействует с ферментом с обращением конфигурации, затем гликозильный остаток переносится на акцептор также с обращением конфигурации, в результате восстанавливается конфигурация, имевшаяся в исходном соединении.

Аналогичным образом осуществляется и биосинтез полисахаридов. Амилоза синтезируется в клетке несколькими путями:



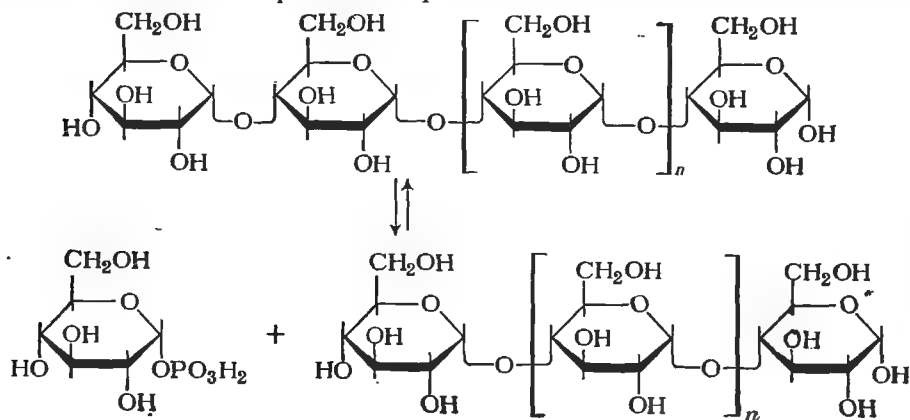
E_1 —фосфорилаза мышц, E_2 и E'_2 —трансгликозилазы, E_3 —амиломальтаза

Синтез полисахаридов с разветвленной структурой осуществляется под действием «ветвящих ферментов», которые катализируют внутримолекулярное трансгликозилирование, вызывающее изомеризацию линейного полимера. Так, ветвящий фермент Кори, выделенный из сердца, мозга и печени, способен катализировать образование (1→6)-связи, а «Q-фермент», содержащийся в картофеле и других растениях, изомеризует одну из каждых двадцати (1→4)-связей амилозы в (1→6)-связь.

Катаболизм углеводов

В процессе катаболизма сложные углеводы в конечном итоге распадаются до CO_2 и H_2O . Можно выделить два основных этапа катаболизма углеводов. На первом этапе происходит расщепление полисахаридов до моносахаридов, на втором — расщепление моносахаридов.

Наиболее хорошо изучен катаболизм крахмала. Расщепление α -(1→4)-гликозидных связей происходит путем фосфоролиза и катализируется фосфорилазами. В результате реакции фосфоролиза отщепляется α -D-глюкопиранозилфосфат от невозстанавливающего конца линейной цепи. Эта реакция обратима:



Фосфорилазы полностью расщепляют амилозу до α -D-глюкопиранозилфосфата. Разветвленный полисахарид амилопектин гидролизуются примерно на 55% с образованием высокомолекулярного предельного декстрина*. Разрушение α -(1 $\rightarrow$ 6)-гликозидных связей осуществляется амилозо-1,6-глюкозидазой. Возникающие при этом линейные декстрины вновь способны расщепляться фосфорилазой. Таким образом при действии двух ферментов достигается полное расщепление амилопектина.

Фосфоролитический путь распада гликогена и крахмала характерен для внутриклеточного распада этих полисахаридов.

Распад полисахаридов под действием внеклеточных ферментов протекает до моносахаридов, поскольку только моносахариды могут проникать через клеточную мембрану, а фосфаты сахаров лишены этой способности. Ряд ферментов растений может расщеплять полисахариды. Так, β -амилаза разрушает α -(1 $\rightarrow$ 4)-гликозидные связи крахмала с образованием мальтозы. α -(1 $\rightarrow$ 6)-Гликозидные связи в местах разветвления расщепляются «Р-ферментом». При гидролизе крахмала в присутствии α -амилазы возникает смесь соединений: мальтоза, мальтотриоза, глюкоза и низкомолекулярные предельные декстрины. Мальтоза и мальтотриоза расщепляются мальтазой до глюкозы.

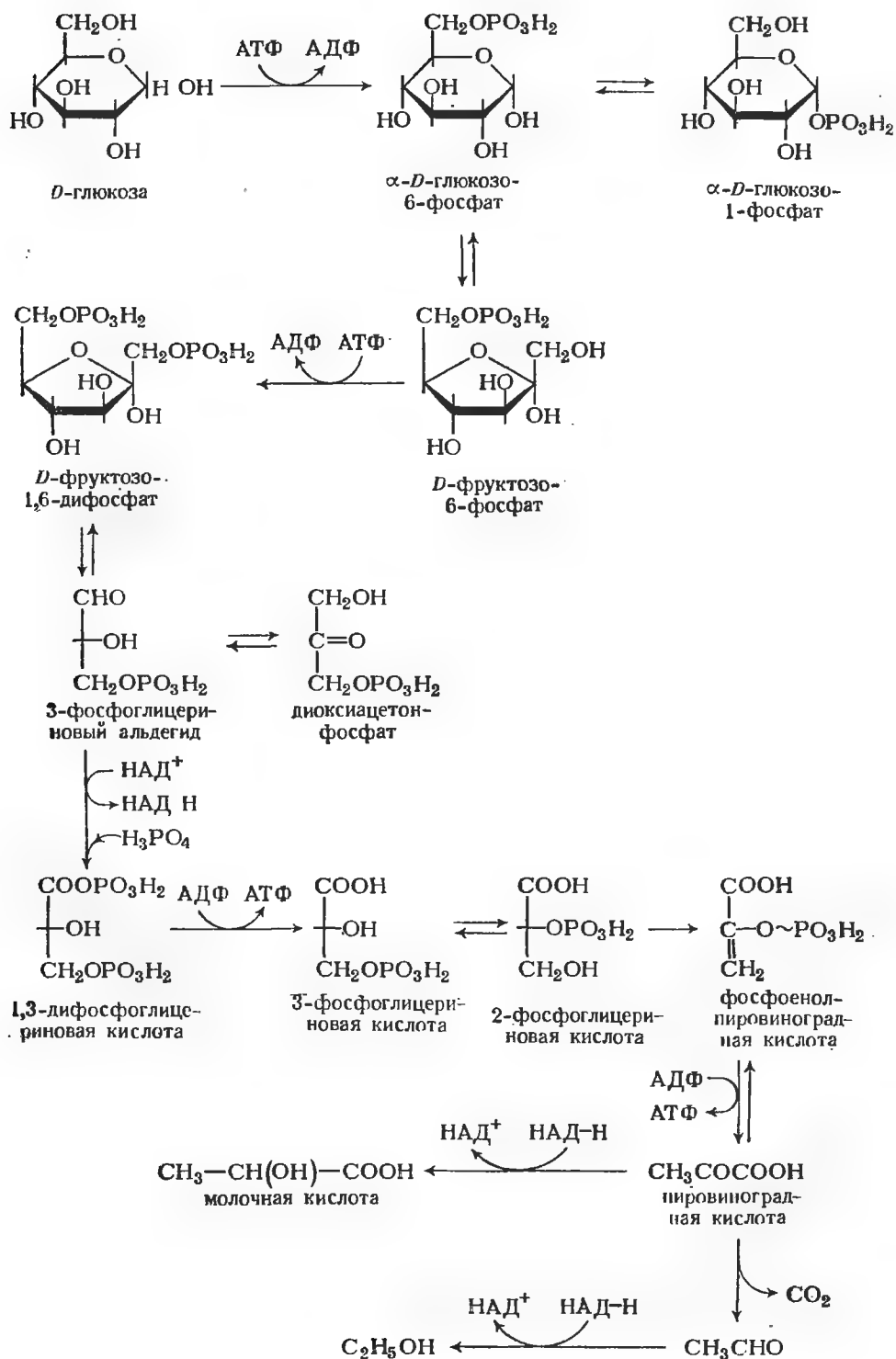
Дальнейшее расщепление моносахаридов протекает двумя универсальными путями. Один из них — анаэробный путь или гликолиз (брожение) — приводит к распаду одной молекулы глюкозы на две молекулы молочной кислоты. Гликолиз часто называют распадом по Эмбдену—Мейергофу—Парнасу в честь исследователей, установивших последовательность ферментативных реакций данного пути. Второй путь представляет аэробный процесс, заключающийся в окислении глюкозы до CO_2 и H_2O . Последовательность ферментативных реакций этого процесса называется окислительным пентозофосфатным циклом или гексозомонофосфатным шунтом.

Гликолиз. Первой стадией процесса является получение α -D-глюкозо-6-фосфата. Субстратами в этой реакции могут быть D-глюкоза или α -D-глюкозо-1-фосфат. Превращение D-глюкозы происходит под действием АТФ и катализируется глюкокиназой. Изомеризация α -D-глюкозо-1-фосфата катализируется фосфоглюкомутазой, а изомеризация α -D-глюкозо-6-фосфата в D-фруктозо-6-фосфат — фосфоглюкоизомеразой. D-фруктозо-6-фосфат фосфорилируется АТФ в присутствии фермента фосфофруктокиназы до фруктозо-1,6-дифосфата. В результате ретроальдольного расщепления этого соединения, катализируемого альдолазой, получают две триозы: 3-фосфоглицериновый альдегид и диоксиацетонфосфат. Последующее превращение 3-фосфоглицеринового альдегида в 1,3-дифосфоглицериновую кислоту происходит под действием НАД^+ и H_3PO_4 и катализируется глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназой. 1,3-Дифосфоглицериновая кислота, являющаяся высокоэнергетическим соединением, фосфорилирует АДФ, давая АТФ и 3-фосфоглицериновую кислоту; реакция катализируется фосфоглицераткиназой. На данной стадии химическая энергия, полученная в результате распада соединений, запасается в виде АТФ, причем обра-

* Декстринами называют циклические олигосахариды



Распад моносахаридов по пути Эмбдена—Мейергофа—Парнаса:



зуются две молекулы АТФ из двух молекул 3-фосфоглицеринового альдегида.

3-Фосфоглицериновая кислота под действием фосфоглицеромутазы изомеризуется в 2-фосфоглицериновую кислоту. Далее под действием фосфопируват-гидратазы происходит отщепление воды. Образовавшаяся фосфоенолпировиноградная кислота также является высокоэнергетическим соединением и участвует в синтезе АТФ из АДФ, превращаясь в пировиноградную кислоту. Реакция протекает под действием фермента пируваткиназы. В результате данной реакции синтезируется еще 2 молекулы АТФ. Таким образом, в процессе гликолиза синтезируется 4 молекулы АТФ, однако на первой и третьей стадиях расходуется 2 молекулы АТФ, т. е. суммарно синтезируется 2 молекулы АТФ.

Процесс гликолиза завершается восстановлением пировиноградной кислоты в молочную кислоту действием НАД-Н и фермента лактатдегидрогеназы. Это восстановление сочетается с окислением 3-фосфоглицеринового альдегида, в процессе которого получается НАД-Н.

Превращение пировиноградной кислоты в молочную происходит в мышцах; в дрожжевых клетках пировиноградная кислота под действием пируватдекарбоксилазы декарбоксилируется в ацетальдегид, который затем восстанавливается НАД-Н в присутствии алкогольдегидрогеназы в этиловый спирт.

Процесс гликолиза тормозится кислородом (эффект Пастера). Очевидно, действие кислорода снижает активность ряда ферментов гликолиза.

В клетках и тканях животных и человека пировиноградная кислота в присутствии кислорода легко декарбоксилируется, превращаясь в ацетилкофермент А, который далее окисляется до CO_2 и H_2O в цикле трикарбоновых кислот (см. стр. 399).

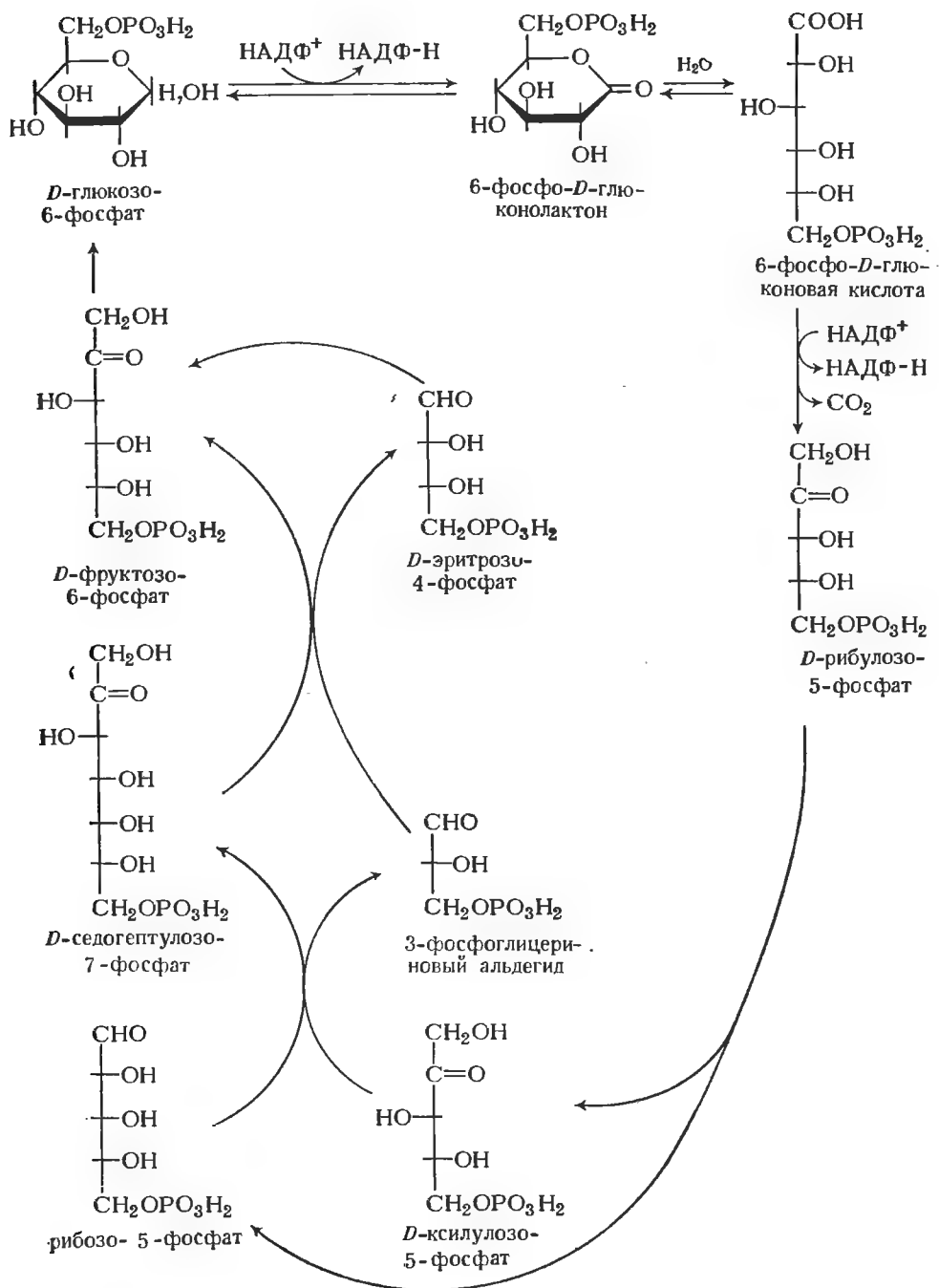
Окислительный пентозофосфатный цикл. В пентозофосфатном цикле начальным субстратом является α -D-глюкозо-6-фосфат. Он окисляется НАДФ⁺ в присутствии глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназы в 6-фосфо-D-глюконолактон, который гидролизует в 6-фосфо-D-глюконовую кислоту под действием фермента глюконолактоназы. Далее, 6-фосфо-D-глюконовая кислота декарбоксилируется и окисляется в D-рибулозо-5-фосфат под действием фосфоглюконат-дегидрогеназы. D-Рибулозо-5-фосфат под действием фосфопентозэпимеразы превращается в D-ксилулозо-5-фосфат и рибозо-5-фосфат, которые далее подвергаются транскетолазной реакции (перенос группы — COCN_2OH), превращаясь в D-седогептулозо-7-фосфат и 3-фосфоглицериновый альдегид. Трансальдолазная реакция последних соединений катализируется ферментом трансальдолазой и приводит к D-фруктозо-6-фосфату и D-эритрозо-4-фосфату. D-Фруктозо-6-фосфат переходит в D-глюкозо-6-фосфат и цикл замыкается.

D-Эритрозо-4-фосфат и D-ксилулозо-5-фосфат также способны подвергаться транскетолазной реакции (фермент транскетолаза), давая фруктозо-6-фосфат, превращающийся затем в D-глюкозо-6-фосфат.

Таким образом, в пентозофосфатном цикле происходит окисление моносахаридов до двуокиси углерода с промежуточным образованием пентозо- и гексозофосфатов.

Превращение 1 моль D-глюкозо-6-фосфата в 1 моль D-рибулозо-5-фосфата сопровождается выделением 2 моль НАДФ-Н. В пентозофосфатном цикле совершенно не образуется АТФ.

Окислительный пентозофосфатный цикл:



Промежуточные продукты пентозофосфатного цикла могут быть использованы как субстраты в других реакциях клеточного обмена.

Рассмотренные пути катаболизма являются общими для различных организмов. Наряду с ними существуют и некоторые специфические пути распада, например окисление глюкозы до CO_2 через глюкуроновую кислоту. Однако вследствие их подчиненного значения для метаболизма клетки они здесь не будут рассмотрены.

БЕЛКОВЫЕ СОСТАВЛЯЮЩИЕ УГЛЕВОД-БЕЛКОВЫХ КОМПЛЕКСОВ

Белковые компоненты углеводов-белковых комплексов состоят из аминокислот, соединенных пептидными связями. Вместе с тем наблюдаются и некоторые характерные для данного класса соединений особенности, например пониженное содержание ароматических и серусодержащих аминокислот. В некоторых гликопротеинах наблюдается повышенное содержание оксикислот — серина и треонина, а так же пролина и глицина [56]. Высокомолекулярные белки гликопротеинов обычно имеют стандартный набор аминокислот.

Одним из основных методов анализа белковых составляющих углеводов-белковых комплексов является кислотный гидролиз и количественное определение аминокислот. Однако следует иметь в виду легкое образование интенсивно окрашенного гумина при наличии углеводов в гидролизате аминокислот (см. кн. 1). Присутствие в гидролизате гексозаминов может осложнить аминокислотный анализ, поскольку они проявляются нингидрином и элюируются аналогично аминокислотам. N- и C-Концевые остатки определяются так же, как для обычных белков (см. кн. 1).

УГЛЕВОД-БЕЛКОВЫЕ КОМПЛЕКСЫ

Смешанные биополимеры, содержащие углеводные и аминокислотные фрагменты, достаточно разнообразны по структуре.

Был предпринят ряд попыток классификации этих соединений, однако ни одну из предложенных систем нельзя считать безупречной. Наиболее рациональной в настоящее время следует признать классификацию Готтшалка, в основу которой положены структурные детали углеводной части (простетической группы углеводов-белковых комплексов).

Различные системы классификации углеводов-белковых комплексов приведены ниже:

1. Система Майера [57]

Углевод-белковые комплексы, содержащие гексозамины.

A. Мукополисахариды

1) Содержащие уоновые кислоты

а) не содержащие сульфогрупп (гиалурионовая кислота)

б) содержащие сульфогруппы (хондроитинсульфат)

2) Нейтральные мукополисахариды (хитин и вещество группы крови A).

Б. Мукопротеины — гликопротеины, содержащие нейтральные мукополисахариды неизвестного состава (овомукоид, овомуцин, серомукоид, овальбумин, сывороточный глобулин, гонадотропный гормон мочи беременных).

II. Система Стейси [50]

Углевод-белковые комплексы с различными углеводными остатками.

А. Мукополисахариды — углевод-белковые комплексы с преимущественным содержанием углеводов, участвующие в реакциях, характерных главным образом для полисахаридов [гиалуроновая кислота, хондроитинсульфаты, гепарин, хитин, группоспецифические вещества крови А, В, О(Н), бактериальные полисахариды].

Б. Мукопротеины — углевод-белковые соединения с относительно высоким содержанием белка или пептидов: их химическое поведение аналогично поведению белков (овомукоид, мукопротеины сыворотки, гормоны гипофиза, подчелюстные муцины).

В. Гликолипиды — комплексы углеводов с липидами.

III. Система Джинлоза [58]

А. Гликозаминогликуроногликаны — полисахариды.

Б. Полисахарид-белковые комплексы — соединения, в которых углеводный компонент присоединен к полипептидной части молекулы нековалентной связью (солеобразование, водородная связь и т. д.).

В. Гликопротеины, гликополипептиды, гликопептиды — вещества, в которых углеводный компонент присоединен к полипептидному ковалентной связью.

Г. Гликолипиды — комплексы углеводов с липидами.

IV. Система Готтшалка [56, 59]

А. Полисахарид-белковые комплексы характеризуются наличием повторяющегося звена и относительно большого числа моносахаридных остатков. Связь между полисахаридом и белком ковалентная или электростатическая.

Б. Гликопротеины — конъюгированные белки, которые содержат в качестве простетических групп один или несколько гетеросахаридов с относительно небольшим числом моносахаридных остатков, лишенных повторяющегося звена и присоединенных ковалентно к полипептидной цепи.

В соответствии с классификацией Готтшалка углевод-белковые комплексы разделяются на две большие группы: полисахарид-белковые комплексы и гликопротеины [56].

Для биополимеров первой группы характерно высокое содержание углеводов (70—80%). Некоторые из них сульфированы и являются сильными кислотами. Углеводные фрагменты полисахарид-белковых комплексов имеют регулярное строение. Углеводный и пептидный фрагменты соединены между собой ковалентной связью (гепарин, хондроитинсульфаты и др.) или ионными и водородными связями (гликуроно-гликозиламиногликаны).

В гликопротеинах преобладает белковый фрагмент, в связи с чем они имеют ряд структурных особенностей, отличающих их от полимеров первой группы. Углеводные фрагменты этих соединений наиболее часто представлены поли- и олигосахаридами нерегулярного строения. Степень полимеризации моносахаридов в цепях невелика. В гликопротеинах подчелюстной железы быка и овцы углеводная простетическая группа представлена дисахаридом, в овальбумине — октасахаридом, в орозомукоиде найден декасахарид, в фетуине содержится 17 углеводных остатков. Типичными моносахаридными звеньями в этих веществах являются аминосахара, галактоза, фукоза и нейраминная кислота, присоединенная к концам углеводных фрагментов.

В общем виде молекулу гликопротеинов можно представить как одну или несколько пептидных цепей, к которым через гидроксильные группы серина или треонина или через карбоксигруппу аспарагиновой кислоты присоединены одна или несколько гетеросахаридных группировок с мол. массой от 512 до 35 000. Молекулярная масса различных гликопротеинов варьирует от 16 000 до нескольких миллионов.

К гликопротеинам относят и так называемые вещества групп крови, хотя в отличие от других гликопротеинов они содержат до 80% углеводов. Такое отнесение сделано на основании структуры их углеводной части (состав и разветвленность гетеросахаридных цепей).

МЕТОДЫ ВЫДЕЛЕНИЯ УГЛЕВОД-БЕЛКОВЫХ КОМПЛЕКСОВ

Выделение углеводов-белковых полимеров является сложным процессом вследствие трудности отделения примеси белков или полисахаридов. Кроме того, при выделении нередко наблюдается деструкция полимера.

Для выделения таких биополимеров широко применяется фракционированное осаждение (например, спиртом), позволяющее отделить некоторые гликопротеины от белков. Для отделения белков используют также осаждение солями или экстракцию фенолом. Применение различных видов хроматографии (иониты, сефадексы) позволяет получить достаточно чистые препараты углеводов-белковых комплексов.

Многие гликопротеины устойчивы к действию протеолитических ферментов, поэтому сопутствующие белки могут быть разрушены ферментами. Удаление примесей гликуроногликозиламиногликанов удаётся иногда путем деструкции их гиалуронидазой.

Существует ряд общепринятых методов определения гомогенности препаратов углеводов-белковых полимеров.

Прежде всего необходимо определить понятие «гомогенность» для рассматриваемого класса соединений, поскольку оно отличается от аналогичного понятия в применении к белкам. Углевод-белковые полимеры полидисперсны, т. е. препараты индивидуальных биополимеров состоят из молекул в общем одинакового химического строения, отличающихся друг от друга лишь незначительно, например небольшими изменениями молекулярной массы, различным количеством сиаловых кислот [60]. Полидисперсность иногда является следствием воздействия протеолитических ферментов или других реагентов, применяющихся при обработке, но вместе с тем она является характерной природной особенностью полимеров данного типа. Когда говорят об индивидуальности гликопротеинов и других углеводов-белковых соединений, то имеют в виду, что данная фракция содержит смесь близких по структуре и свойствам соединений, которая теоретически может быть разделена на более узкие фракции.

Широко используемым методом контроля индивидуальности этих соединений является ультрацентрифугирование.

Для разделения гликопротеинов используется также метод электрофореза. Электрофорез в растворах, так называемый свободный электрофорез, проводится в ячейке Тизелиуса. Признаком гомогенности служит наличие одиночного пика при двух или трех достаточно далеких значениях pH. На подвижность вещества при электрофорезе влияют два независимых фактора: заряд вещества и гидродинамическое сопротивление. При взаимной компенсации этих факторов два различных вещества могут иметь одинаковую подвижность, но это не может повторяться при различных pH.

Другой тип электрофореза осуществляется в поддерживающих средах, например в гелях (крахмал, агар-агар, полиакриламид), что значительно повышает разрешающую силу электрофоретического анализа и позволяет работать с малыми количествами веществ. В качестве примера можно привести разделение препарата фетуина в геле. По данным ультрацентрифугирования и иммуноэлектрофореза этот препарат гомогенен, однако при электрофорезе на поливинилхлориде при pH 8 он разделяется на несколько фракций, отличающихся содержанием сиаловых кислот. Такое же тонкое разделение этого препарата удалось достичь на ДЭАЭ-сефадексе. Следует отметить, что хроматография на колонках и гель-фильтрация дают достаточно полное представление о гомогенности и широко применяются в практике.

Некоторые методы определения гомогенности основаны на иммунохимических свойствах углеводов-белковых комплексов. Многие из них

обладают антигенной активностью — могут взаимодействовать с определенными сыворотками, т. е. препаратами антител, с образованием преципитатов. Скорость образования преципитатов зависит от структуры антигенов, которые могут отличаться друг от друга очень тонкими деталями, например только типом конечных моносахаридных звеньев.

В методе иммунодиффузии наблюдается полоса преципитации при диффузии препарата в гель, содержащий антитела. Каждая система антиген—антитело образует свою полосу. Диффузия может быть проведена в тонкой пленке геля или в вертикальных трубках. При помощи иммунофореза можно разделить очень сложную смесь близких по физико-химическим свойствам гликопротеинов. Первоначально проводится электрофорез в агар-агаровом геле, а затем иммунодиффузия (в перпендикулярном направлении).

Методы, основанные на иммуно-химических свойствах веществ, в последнее время широко используются при работе со многими гликопротеинами, например с веществами групп крови, которые проявляют сильные антигенные свойства. Разработаны методы количественного определения их преципитатов с сыворотками.

Рассмотренные методы используются не только для определения чистоты гликопротеинов, но и для изучения их тонкой структуры.

Наряду с перечисленными методами применяют приемы и методы анализа, принятые в химии белка, например определение концевых аминок групп и др. Полное доказательство гомогенности исследуемых веществ может дать только сочетание нескольких различных методов.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ РАЗМЕРА И ФОРМЫ МОЛЕКУЛ УГЛЕВОД-БЕЛКОВЫХ СОЕДИНЕНИЙ

Молекулы углевод-белковых полимеров разнообразны по форме и молекулярной массе. Они могут быть сильно вытянуты или иметь форму глобулы. Гликопротеины, содержащие небольшое количество углеводов и близкие по свойствам к белкам, не представляют трудностей для физико-химических определений. Богатые углеводами гликопротеины и полисахарид-белковые комплексы с высокой молекулярной массой и большим количеством заряженных групп, напротив, являются трудными объектами для изучения.

Основные отличия гликопротеинов от белков заключаются в полидисперсности, высокой степени пространственной асимметрии и высокой плотности заряда. Вследствие этого в растворах конфигурация молекул рассматриваемых биополимеров зависит от типа растворителя, концентрации вещества, pH и ионной силы раствора, что безусловно затрудняет применение классических методов белковой химии к изучению таких веществ.

Молекулярная масса углевод-белковых полимеров является величиной усредненной, учитывающей полидисперсность полимеров. Уже на стадии выделения, очистки и определения гомогенности этих биополимеров можно приблизительно оценить их свойства и молекулярную массу. Предварительное определение вязкости веществ и содержания в них сиаловых кислот позволяет выбрать те или иные пути дальнейшего исследования. Молекулярная масса углевод-белковых полимеров может быть рассчитана на основании гидродинамических данных, коэффициентов седиментации, диффузии, характеристической вязкости. Молекулярная масса и форма молекул могут быть вычислены по данным све-

торассеяния или осмометрии. Гель-фильтрация на сефадексах позволяет примерно оценить молекулярную массу полимеров и довольно широко применяется в последнее время.

Существенную информацию о форме молекул полимеров, содержащих углеводы и белки, дает электронная микроскопия и дисперсия оптического вращения.

Для получения достаточно достоверных значений молекулярной массы и размеров молекулы следует использовать несколько методов определения.

УСТАНОВЛЕНИЕ СТРУКТУРЫ УГЛЕВОДНЫХ СОСТАВЛЯЮЩИХ УГЛЕВОД-БЕЛКОВЫХ КОМПЛЕКСОВ

Как указывалось выше, имеются различные типы углевод-белковых соединений, отличающихся по составу и строению углеводных фрагментов и их размерами по отношению к пептидным компонентам. Эти различия определяют способы выделения и очистки таких биополимеров, а также выбор методов, дающих возможность определить структуру соединений или их отдельных участков. Для структурных исследований необходимо использовать препараты веществ, полностью очищенные от примесей.

Углеводные составляющие углевод-белковых полимеров представлены олиго- или полисахаридами. Для установления их структуры применяют различные методы деградации: кислотный и ферментативный гидролиз, периодатное окисление, метилирование и гидролиз, расщепление щелочами. Однако исследуемые биополимеры не всегда могут быть сразу подвергнуты деградации из-за нерастворимости, недоступности атакуемых участков вследствие пространственных затруднений и наличия заряженных групп, затрудняющих атаку расщепляющих реагентов. Существенные трудности для гидролиза представляют остатки аминсахаров и уоновых кислот, гликозидные связи которых устойчивы, поэтому предварительно часто осуществляют превращение этих остатков в производные, не затрудняющие гидролиз.

Сиаловые кислоты, входящие в состав гликопротеинов, защищают их от действия протеолитических ферментов, поэтому необходимо предварительно отщепить их нейраминидазой. После удаления сиаловых кислот гликопротеины частично расщепляются протеолитическими ферментами (папаин, проназа) на гликопептиды, доступные для дальнейшего исследования. Гликопептиды затем обрабатывают ферментами, отщепляющими аминокислоты (например, карбоксипептидазой после защиты конечной аминогруппы), и превращают в олигосахариды, содержащие только одну аминокислоту. Углеводные компоненты гликопротеинов, имеющих щелочелабильную связь углевод—аминокислота, отщепляют щелочной обработкой или ферментами, разрушающими связи такого типа. Полученные таким образом гетеросахариды или гетеросахариды с одной аминокислотой очищают от примесей пептидов и аминокислот переосаждением из водноорганических смесей (вода—спирт, вода—ацетон), экстракцией фенолом, хроматографией, электрофорезом или гель-фильтрацией.

Дальнейший анализ этих низкомолекулярных соединений заключается в определении их молекулярной массы, состава, порядка соединения отдельных моносахаридов, типа и конфигурации гликозидных связей с помощью методов, разработанных для исследования строения сложных углеводов.

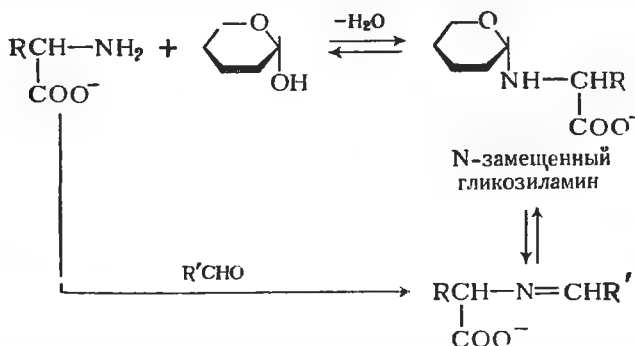
Гидролиз гликозидных связей

Кислотный гидролиз. Для идентификации и количественного определения моносахаридов, входящих в состав олиго- и полисахаридов и углеводов-белковых полимеров, применяется кислотный гидролиз, в процессе которого расщепляются гликозидные связи.

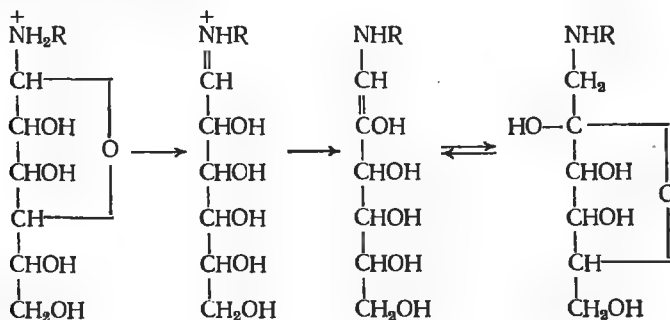
В ряде случаев кислотный гидролиз является нелегкой задачей, так как гликозидные связи, образуемые различными моносахаридами, отличаются по устойчивости. Очень стабильны связи у аминсахаров, в то же время проведение гидролиза в более жестких условиях усиливает деструкцию моносахаридов.

При гидролизе возможна «кислотная реверсия», т. е. ресинтез олигосахаридов, а также взаимодействие углеводов с аминокислотами (реакция Майяра). Установлено, что в реакцию с аминокислотами вступают только восстанавливающие сахара, причем пентозы более реакционноспособны, чем гексозы. Среди гексоз наибольшая реакционная способность отмечается у *D*-фруктозы, затем следуют *D*-галактоза, *D*-манноза и *D*-глюкоза. Ацилированные аминсахара не вступают в реакцию с аминокислотами до температуры 53 °С.

Вероятно, что начальной стадией реакции Майяра является образование *N*-замещенных гликозиламинов путем взаимодействия непротонированной аминогруппы аминокислот, пептидов или белков с гликозидным гидроксилом моносахарида, затем образуется шиффово основание. Однако нельзя исключить и возможность реакции аль-формы гексозы ($R'CHO$) с аминокислотой:



N-Замещенные гликозиламины в условиях кислотно-основного катализа изомеризуются в *N*-замещенные 1-амино-1-дезоксигексозы (перегруппировка Амадори):



Согласно предложенному циклическому механизму перегруппировки, протонированный гликозиламин под действием молекулы воды (или метанола) претерпевает раскрытие пиранозного кольца с образованием альдимины, который превращается затем в аминенол. Последний образует равновесную смесь с циклической и кетоформами производного фруктозы. Аминенол способен также претерпевать деградацию с отщеплением воды и образованием производных фурана. Для протекания перегруппировки Амадори необходимо, чтобы аминный азот в исходном гликозиламине обладал достаточной основностью, позволяющей его протонирование.

Предполагаемые промежуточные продукты перегруппировки Амадори аналогичны продуктам реакции Лобри де Брюина — Альберда ван Экенштейна (см. стр. 29), однако реакция Лобри де Брюина — Альберда ван Экенштейна обратима и количество продуктов разложения в ней незначительно, а перегруппировка Амадори, напротив, практически необратима и количество получаемых при этом окрашенных продуктов деградации сопоставимо с количеством основного вещества.

В соответствии с изложенным выше становится очевидной необходимость тщательного подбора условий гидролиза, ограничивающих протекание побочных реакций.

Принято считать, что кислотный гидролиз гликозидов протекает по мономолекулярному механизму и инициируется протонированием гликозидного гидроксила. Общая скорость гидролиза определяется рядом факторов: характером агликона, конформацией молекулы, размерами окисного цикла, конфигурацией гликозидной связи и наличием в молекуле сахаров групп, несущих заряд (COOH , NH_2). Гликозидные связи фураноз расщепляются быстрее, чем в случае пираноз. Еще быстрее гидролизуются кетозиды, например фруктофуранозиды расщепляются в 10 000 раз быстрее, чем изомерные альдопиранозиды. Повышенной лабильностью отличаются гликозидные связи 2-дезоксисахаров (фукоза). Существует различие и в скорости гидролиза α - и β -гликозидов, что, очевидно, связано с пространственными факторами. В большинстве случаев α -гликозидные связи гидролизуются быстрее, чем β -связи. Отмечается большая лабильность α -(1 $\rightarrow$ 4)-связей по сравнению с α -(1 $\rightarrow$ 6)-связями.

Очень устойчивы к кислотному гидролизу гликозидные связи 2-амино-2-дезоксисахаров. Возможной причиной устойчивости таких связей к гидролизу является ингибирование протонирования гликозидного гидроксила вследствие влияния положительного заряда группы $^+\text{NH}_3$ при C_2 . Этот фактор оказывается существенным и при гидролизе N-замещенных аминосахаров, так как одновременно протекает гидролиз амидной связи.

В некоторых полимерах, содержащих аминосахара, например в гепарине, присутствуют лабильные сульфаминогруппы. Гидролиз гликозидных связей этих соединений протекает значительно медленнее, чем в случае N-ацилированных производных. Определенные трудности встречаются и при гидролизе углеводных последовательностей, содержащих остатки уроновых кислот.

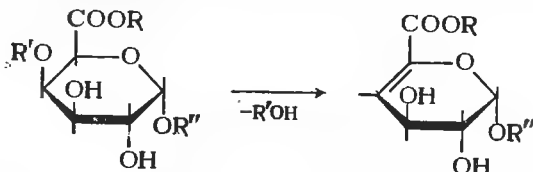
Приведенные данные об устойчивости различных гликозидных связей показывают, что выбор оптимальных условий кислотного гидролиза может способствовать более или менее направленному расщеплению гликозидных связей с разрывом связей одного типа и сохранением

других связей и получением наряду с моносахаридами олигосахаридов. Так, для некоторых природных олигосахаридов оказалось возможным подобрать условия для избирательного отщепления сиаловых кислот и фукозы. При гидролизе полисахаридов соединительной ткани происходит их частичное расщепление до дисахаридов: из гиалуроновой кислоты получается гиалобиуроновая кислота, а из хондроитинсульфатов — хондрозин.

Для частичной деструкции полисахаридных цепей хорошие результаты дает ацетоллиз — обработка смесью уксусного ангидрида и уксусной кислоты в присутствии серной кислоты. При ацетоллизе не отщепляются сиаловые кислоты и возможно получение олигосахаридов, содержащих этот углевод. Для деструкции полисахаридов применяют также метанолиз, меркаптолиз и формолиз.

Перспективным методом является гидролиз полистиролсульфокислотами, растворимыми или нерастворимыми в воде. Для кислот этого типа характерна высокая локальная концентрация ионов водорода при общей низкой кислотности раствора, что обуславливает высокую эффективность гидролиза. Гидролиз поли- и олигосахаридов полимерными сульфокислотами можно сочетать с диализом, отделяя образовавшиеся при гидролизе олигосахариды от гидролизующего реагента, что позволяет избежать их дальнейшей деструкции, а также кислотной реверсии.

Интересным подходом является разработка методов модификации гетеросахаридов, стабилизирующих или, наоборот, лабилизирующих некоторые гликозидные связи. Например, в полимере остатки уоновых кислот превращают в амиды, а затем в амины по реакции Гофмана, после чего становится возможным расщепление в мягких кислотных условиях [61]. Имеются данные о возможности избирательного щелочного расщепления полисахаридов алкогелятом натрия по гликозидной связи с остатками уоновой кислоты. Это расщепление приводит к ненасыщенному соединению:



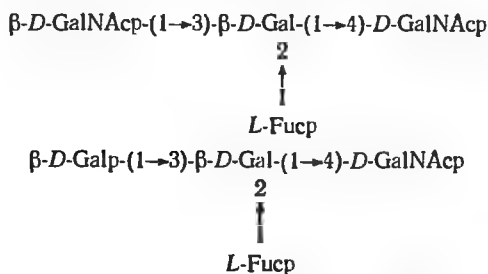
Ферментативный гидролиз. В структурных исследованиях углеводов белковых полимеров важная роль принадлежит ферментам, специфически отщепляющим определенные сахара или гидролизующим гликозидные связи определенного типа. Характерной особенностью ферментативного гидролиза является гидролиз до низших олигосахаридов, которые в отличие от высших плохо расщепляются ферментами.

Ферменты, расщепляющие гликозидные связи, носят название гликозидаз или гликогидролаз. Конкретные ферменты называют в зависимости от субстрата. Так, известны различные глюкозидазы, расщепляющие α- (амилазы) или β- (целлюлазы) гликозидные связи, галактозидазы, нейраминидазы, гиалуронидазы и т. д. Сравнительно недавно получены ферменты, гидролизующие связи углеводов — аминокислота в гликопротеинах.

Щелочное расщепление. Гликозидные связи устойчивы к действию щелочей, но если олиго- или полисахарид содержит восстанавливающий сахар, происходит деструкция углеводной цепи, начиная с этого восстанавливающего остатка. Характер продуктов распада определя-

ется положением заместителей, а в случае олиго- и полисахаридов — местом присоединения каждого последующего звена. Деструкция (1→3)-гликозидных связей протекает быстро, (1→4)- и (1→6)-гликозидные связи расщепляются значительно медленнее, (1→2)-связь устойчива.

При щелочной деградации олигосахаридов, содержащих фукозу, легко отщепляющуюся кислотами, удается сохранить гликозидные связи фукозы. Так, при расщеплении групповых веществ крови А и В получены олигосахариды, содержащие фукозу [62]:



Щелочная деградация применяется при исследовании гликопротеинов и гликопептидов, содержащих щелочелабильную связь углевод—аминокислота. Под действием щелочи происходит разрыв этой связи и освобождение олиго- или полисахаридов, в свою очередь подвергающихся щелочной деградации. С целью воспрепятствовать глубокой деградации до сахариновых кислот применяют сочетание щелочной обработки (щелочь или триэтиламин) с восстановлением натрийборгидридом. Этот метод эффективен при изучении группоспецифических веществ крови — гликопротеинов, которые содержат разветвленные олигосахаридные цепи, присоединенные к аминокислотной цепи. Значительная часть связей углевод—аминокислота в этих биополимерах щелочелабильна.

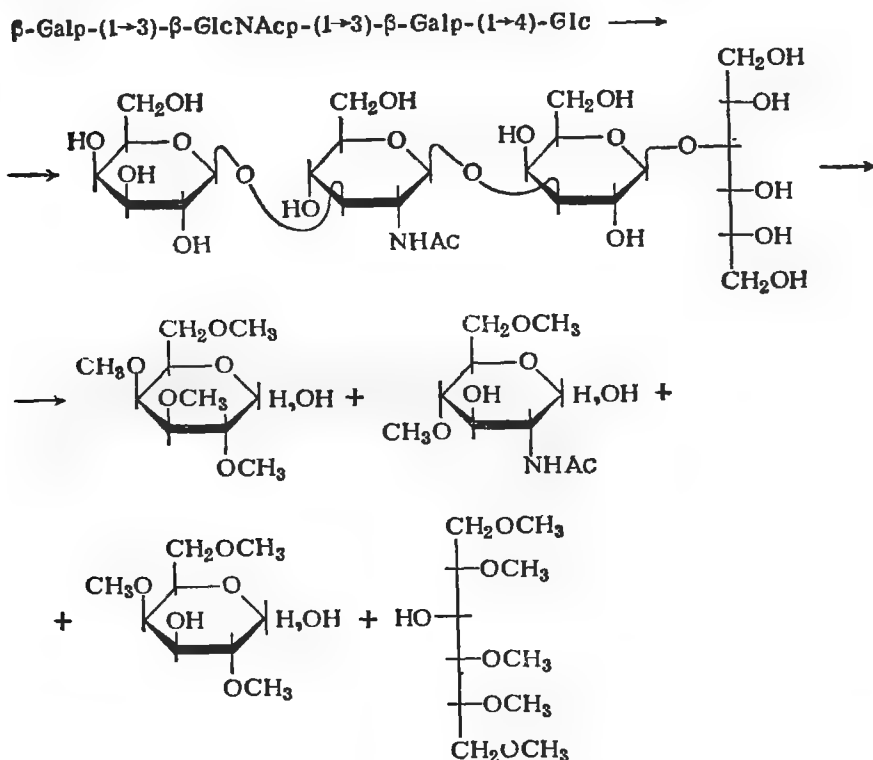
Фрагменты, полученные при частичном кислотном или ферментативном гидролизе или сольволизе, а также после щелочной деградации, являются материалом для дальнейших исследований. Качественный и количественный состав олигосахаридов определяется при помощи кислотного гидролиза. Наличие восстанавливающих остатков позволяет судить о разветвленности фрагмента. Для полисахаридов с неразветвленными цепями восстанавливающая способность дает возможность оценить их молекулярную массу. Обычными реагентами для количественного определения восстанавливающих групп являются гипоиодид натрия, соли меди, феррицианид калия, периодат, цианид натрия.

Метод метилирования

Данный метод заключается в исчерпывающем метилировании олиго- и полисахаридов с последующим гидролизом или метанолизом гликозидных связей и идентификацией метилированных сахаров. Метод дает возможность определить место присоединения моносахаридов друг к другу, размеры окисных циклов, места разветвлений, типы и число концевых восстанавливающих и невосстанавливающих звеньев и, та-

ким образом, приблизительное значение молекулярной массы. Применение этого метода для исследования гликопротеинов ограничено, однако он сохраняет свое значение для определения структур продуктов деградации этих биополимеров.

Анализ лакто-N-тетраозы — олигосахарида, входящего в состав многих олигосахаридов женского молока, проведен на продукте его восстановления:



Этим методом невозможно определить последовательность сахаров, однако он дает сведения о концевых звеньях. В сочетании с другими методами, такими как периодатное окисление, ферментативный гидролиз, физико-химические методы идентификации, данный метод является важным источником информации о деталях структуры олиго- и полисахаридных цепей.

При использовании этого метода важно достичь полного метилирования всех гидроксильных групп. Существует несколько методов метилирования. Один из них — метод Хеурса — заключается в обработке олигосахаридов диметилсульфоксидом в присутствии 30%-ного раствора NaOH при комнатной температуре или охлаждении. Для восстанавливающих олигосахаридов метилирование в этих условиях сопровождается щелочной деградацией, поэтому этот метод рекомендуется применять для соединений, устойчивых в щелочных растворах. Высокой эффективностью отличается метод Куна — обработка олигосахарида иодистым метилом или диметилсульфатом в присутствии окиси серебра или окиси бария в диметилформамиде или диметилсульфок-

сиде. Метод Пурди — Ирвинга заключается в действии на поли- или олигосахарид кипящего иодистого метила в присутствии окиси серебра (20—40 ч). Этот метод обычно используют для дометилирования частично метилированного олиго- или полисахарида, растворимого в иодистом метиле или в его смеси с органическими растворителями.

Из рассмотренных методов наиболее эффективным является метилирование по Куну. При проведении реакции для олигосахаридов, у которых восстанавливающее звено присоединено (1→3)-гликозидной связью, происходит довольно заметная щелочная деградация, поэтому целесообразно осуществлять предварительное восстановление таких веществ.

Ряд трудностей возникает при метилировании высокополимерных фрагментов углевод-белковых полимеров, обладающих низкой растворимостью. Для повышения растворимости иногда используют предварительное ацетилирование. Для полного метилирования некоторых полимеров, например хондроитинсульфата, используют несколько последовательных обработок метилирующим реагентом.

Гидролиз метилированных олиго- и полисахаридов протекает труднее, чем исходных неметилированных веществ; в то же время проведение гидролиза в жестких условиях вызывает деструкцию моносахаридов. Более мягким методом является метанолиз, в результате которого образуются метилгликозиды сахаров.

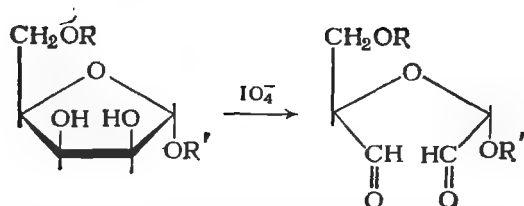
Для разделения полученных после гидролиза или метанолиза метиловых эфиров моносахаридов или их метилгликозидов применяют различные виды хроматографии: распределительную хроматографию на бумаге и колонках с целлюлозой, тонкослойную хроматографию на силикагеле. Высокой разрешающей способностью при использовании небольших количеств веществ обладает газо-жидкостная хроматография. Перед анализом смесь, содержащую метиловые эфиры моносахаридов, дополнительно ацетируют или метилируют для повышения летучести производных моносахаридов. Этим методом удается разделить не только метилированные сахара, но и α - и β -аномеры.

Для выделенных метиловых эфиров сахаров можно определить степень метилирования и при помощи хроматографии осуществить их идентификацию со свидетелями известного строения. В ряде случаев метиловые эфиры можно идентифицировать по физико-химическим свойствам (температура плавления, ИК-спектры, рентгеноструктурный анализ, масс-спектрометрия). Возможно деметилирование полученного эфира треххлористым или трехбромистым бором и идентификация образовавшегося моносахарида.

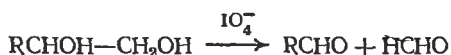
Периодатное окисление

Метод периодатного окисления применяется для установления строения олигосахаридов, полисахаридов, гликопротеинов и гликопептидов. Преимуществом этого метода является то, что расщепление гликольных группировок протекает количественно и анализ требует небольшого расхода вещества.

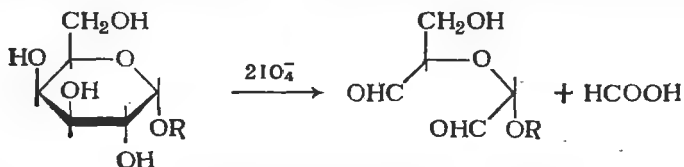
При окислении иодной кислотой или ее солями расщепляются α -гликольные или α -оксиаминогруппировки по С—С-связи с образованием альдегидных групп:



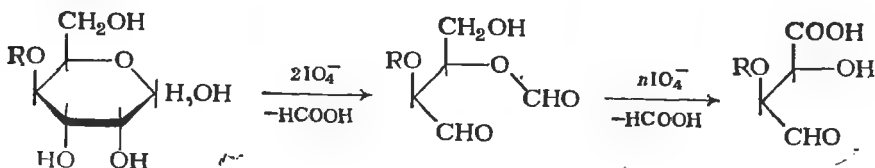
Окисление вещества, содержащего α -гликольную группировку с первичной спиртовой группой, происходит с выделением формальдегида:



Окисление 1,2,3-триольной группировки, содержащей вторичные спиртовые группы, протекает с выделением муравьиной кислоты:



Окисление конечного восстанавливающего сахара сопровождается выделением 2 моль муравьиной кислоты:



Окисление проводят 0,005—1 М раствором периодата при 0—4 °С. После окончания реакции можно точно определить расход периодата. Разработаны и применяются методы количественного определения формальдегида и муравьиной кислоты.

Очень удобной модификацией периодатного окисления является метод Смита. Он заключается в восстановлении окисленного олиго- или полисахарида натрийборгидридом и гидролизе полученного полиола. В зависимости от типа связи (1→2, 1→3, 1→4 или 1→6) получают различные продукты распада. При этом гликозидные связи окисленных остатков становятся более лабильными (как ацетальные). Это делает возможным ступенчатую деградацию исследуемого олигосахарида.

Избирательное расщепление окисленного периодатом полисахарида может быть осуществлено действием фенилгидразина (деградация по Бэрри), который расщепляет не только ацетальные связи, но и гликозидные. По сравнению с методом Смита метод Бэрри имеет ряд недостатков. Так, реакция с фенилгидразином не проходит количественно, а разделение смеси озазонов очень сложно.

Периодатное окисление в сочетании с частичным гидролизом применяется для исследования структур гликопротеинов. Побочными реакциями при взаимодействии с периодатом являются окисление некото-

рых аминокислот — треонина до ацетальдегида, серина до формальдегида; окисляются также пролин, оксипролин, триптофан, цистин, цистеин, метионин.

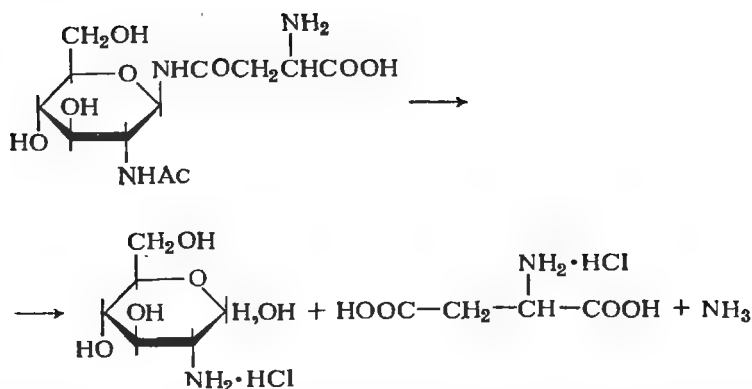


В настоящее время делаются попытки разработки автоматического анализа моносахаридов в полисахаридах и гликопротеинах [63] с использованием метода жидкостной хроматографии их боратных комплексов.

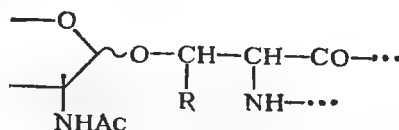
ТИПЫ СВЯЗЕЙ МЕЖДУ УГЛЕВОДАМИ И БЕЛКАМИ В УГЛЕВОД-БЕЛКОВЫХ КОМПЛЕКСАХ

Углевод-белковые полимеры отличаются большим разнообразием структур. Это определяется составом и степенью полимеризации углеводных и пептидных компонентов, характером ковалентных связей между углеводными и пептидными цепями, числом и типом разветвлений. Нельзя не принимать во внимание вторичную и третичную структуры полимерных молекул, обусловленные внутримолекулярными, в том числе и гидрофобными, взаимодействиями, а также способность многих углевод-белковых полимеров к образованию нековалентных связей с белками или гликопротеинами. Это особенно характерно для углевод-белковых комплексов, имеющих большое число полярных группировок. Так, например, гепарин образует с белком плазмы крови комплекс, обладающий высокой антикоагулятивной активностью. Гиалуроновая кислота выделена из ряда источников в виде комплекса с протеином, по-видимому с α -глобулином, который может быть отделен на ДЭАЭ-сефадексе; содержание его в комплексе 20—30%. Хондромукопротеин, представляющий собой ковалентно связанные хондроитинсульфат и белок, образует комплекс с кератосульфатом и сиалогликопротеином. В соединительной ткани хондроитинсульфат и гиалуроновая кислота связаны с коллагеном.

Гепарин и хондроитинсульфат, которые ранее считали полисахаридами, соединены с белками щелсчелабильными связями. В то же время многие углевод-пептидные полимеры имеют стабильную к щелочи связь углеводов с аминокислотами. Такого рода связь была обнаружена после того, как гликопротеины подвергали ферментативной деградации (проназа) до гликопептидов, а затем пептидную цепь укорачивали до одной аминокислоты инкубацией с ферментами (пепсин или карбокси-пептидаза). Подобной деградацией яичного альбумина (овальбумина) [64] и овомукоида удалось получить гетеросахариды, соединенные только с одной аспарагиновой кислотой. Связь этой аминокислоты с остатком углевода устойчива в щелочной среде и более устойчива в кислой среде, чем гликозидные связи. После частичного кислотного гидролиза такого гетеросахарида, связанного с остатком аминокислоты, удалось получить низкомолекулярный фрагмент, состоящий из аспарагиновой кислоты и N-ацетилглюкозамина. При кислотном гидролизе этого соединения выделяются аммиак, аспарагиновая кислота и 2-амино-2-дезоксиглюкопираноза. В данном соединении углеводный остаток и аминокислота соединены амидной связью:



Исследование щелочелабильных связей углеводных и пептидных цепей позволило установить наличие О-гликозидных связей аминоксахара и оксиаминокислоты (серин, треонин):



Такой тип связей обнаружен в муцинах подчелюстных желез, в гепарине, хондроитинсульфатах, кератосульфате [65]. Связующим звеном между углеводными цепями и пептидами являются ксилоза и серин [66]. О-Гликозидные связи аминоксахаров с оксиаминокислотами имеются также в групповых веществах крови; в некоторых гликопротеинах они существуют наравне со щелочестойкими связями (глобулины молока) [67].

Наряду с широко распространенными амидной и О-гликозидной связями могут существовать и другие типы связей углевода с аминокислотой. Высказано предположение о существовании в гликопротеинах О-ацилгликозидной связи, в тейхоевых кислотах доказано наличие сложноэфирной связи аланина с остатками рибита.

ОТДЕЛЬНЫЕ ПРЕДСТАВИТЕЛИ УГЛЕВОД-БЕЛКОВЫХ КОМПЛЕКСОВ

Имеющиеся в настоящее время данные по структуре углевод-белковых комплексов не позволяют описать с исчерпывающей полнотой ни одно из соединений данной группы. В связи с этим ниже рассмотрены лишь наиболее изученные представители двух основных групп углевод-белковых комплексов, выполняющих важные биологические функции, — полисахарид-белковые биополимеры и гликопротеины.

Полисахарид-белковые комплексы

Полисахарид-белковые биополимеры широко представлены в соединительной ткани, которая обуславливает прочность и упругость органов, эластичность их соединения, является барьером для многих болезнетворных бактерий.

В соединительной ткани различают следующие компоненты: коллагеновые и эластиновые волокна и так называемое основное вещество, содержащее комплексы структурно родственных полисахаридов с белками. Полисахаридные фрагменты этих соединений являются линейными, в основной своей части регулярно построенными гликуронилглицозиламиногликанами. Из них довольно хорошо изучены: хондритин-сульфаты (кожа, сухожилия, хрящи), кератосульфат (роговица), гиалуроновая кислота (хрящи, пуповина), гепарин (печень).

Некоторые из этих веществ сульфированы и представляют собой сильные кислоты. Их роль в регулировании солевого обмена отмечается многими исследователями. Эти вязкие полярные вещества придают соединительной ткани свойства молекулярного сита. Она проницаема для кислорода и двуокиси углерода и в то же время предохраняет органы от проникновения чужеродных тел и возбудителей болезней.

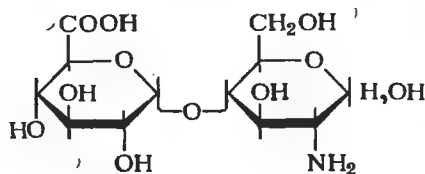
Особенности биологического действия полисахарид-белковых комплексов соединительной ткани связаны с их макромолекулярной структурой, наличием анионных групп, высокой гидрофильностью. Эти вещества участвуют в регулировании осмотического давления в соединительной ткани, содержащей около $\frac{1}{5}$ всей воды организма, в регулировании обмена солей, в том числе кальциевых. По мере старения организма изменяется соотношение этих веществ в соединительной ткани. С этим связано усиление кальцификации тканей, приводящее к атеросклерозу.

Некоторые из полисахарид-протеинов соединительной ткани влияют на коагуляцию крови.

Гепарин. Одним из кислых полисахарид-белковых комплексов соединительной ткани является гепарин. Он вырабатывается печенью, в небольших количествах содержится в легких, селезенке, щитовидной железе, мышцах.

Гепарин обычно выделяют из легких и печени крупного рогатого скота в виде натриевой соли, представляющей собой аморфный порошок белого цвета, растворимый в воде и растворе щелочи и нерастворимый в органических растворителях.

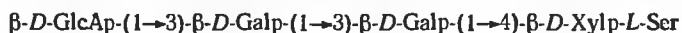
Гепарин сульфирован, он содержит в среднем 5 остатков серной кислоты на 4 моносахаридных звена, причем в отличие от других мукополисахаридов наряду с гидроксильными группами при C_6 аминосахара и C_2 уоновых кислот в гепарине сульфированы аминогруппы [68]. Гепарин может быть разрушен на олигосахариды только после десульфирования. Изучение строения этих олигосахаридов позволило сделать вывод, что структурной единицей этого полимера является дисахарид 4-О- α -D-глюкопирануринозил-2-амино-2-дезокси-глюкопираноза:



Молекула гепарина содержит цепь, состоящую примерно из 50 остатков этого дисахариды, соединенных α -(1 $\rightarrow$ 4)-гликозидными связями. Молекулярная масса гепарина 16 000—20 000.

Гепарин в отличие от гиалуроновой кислоты и хондроитинсульфата устойчив к действию гиалуронидазы, расщепляющей β -гликозидные связи мукополисахаридов; это может быть использовано при его очистке от примесей.

Гепарин включает также пептидную компоненту, связанную с полисахаридом ковалентной щелочелabile связью. Строение участков, содержащих эту связь, установлено анализом продуктов кислотного гидролиза, среди которых был обнаружен дисахарид β -Galp-(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-Xyl. При кислотном гидролизе гепарина и десульфировании продуктов гидролиза получены олигосахариды, содержащие аминокислоту:



В некоторых олигосахаридах, полученных гидролизом гепарина, обнаружена идиуроновая кислота. Ее присутствие в гепарине подтверждено ЯМР-спектрами и выделением 1,6-ангидро-L-идозы [69].

В гепарине, как и в других сульфированных полисахаридах, наблюдается ориентирование сульфогрупп на поверхности спирали, и вследствие этого высокий поверхностный заряд молекулы. Ранее предполагали, что сульфогруппы в гепарине частично связаны внутримолекулярными ковалентными связями, образуя эфирные мостики. Однако позднее было установлено, что конфигурация гепарина стабилизируется в основном не ковалентными, а водородными связями между N-сульфогруппами и гидроксилами при C₃ соседних остатков глюкуроновой кислоты. Отщепление 33% сульфогрупп меняет конфигурацию молекул и обуславливает потерю биологической активности.

Гепарин образует диссоциирующие комплексы с белками путем нековалентных взаимодействий. Такой комплекс с гликопротеином плазмы является высокоэффективным антикоагулянтом.

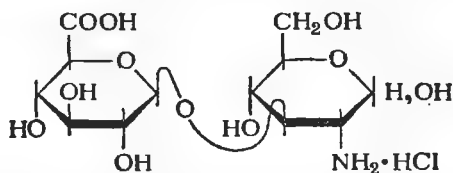
Антикоагулятивная активность гепарина и его комплексов с белками заключается в торможении превращения протромбина в тромбин. Гепарин применяется в терапевтической практике для предупреждения инфаркта миокарда и ликвидации послеоперационных тромбозов. Передозировка гепарина приводит к повышенной кровоточивости, капиллярным кровоизлияниям. Для гепарина характерно также антилипемическое действие (липемия — связывание частичек нейтрального жира, попадающего в кровь после приема пищи или при патологическом нарушении обмена жиров).

Гепаритин-сульфат — биополимер, близкий по структуре и свойствам гепарину. Он является структурным элементом стенок кровеносных сосудов. Полимер содержит эквимольные количества 2-амино-2-дезокси-D-глюкозы и гексуриновых кислот и, в среднем, одну сульфогруппу на одно повторяющееся звено. Примерно половина остатков глюкозамина N-сульфирована, остальные — N-ацетилированы. Высокое положительное значение угла вращения плоскости поляризации свидетельствует о наличии α -гликозидных связей; это подтверждается также изучением строения продуктов ферментативного гидролиза гепаритин-сульфата.

Гиалуроновая кислота. Свойства соединительной ткани в значительной степени определяются присутствием в ней гиалуроновой кислоты — несульфированного кислого полисахарида. Она является как бы цементирующим компонентом в соединительной ткани, что связано с ее высокой вязкостью и гидрофильностью. Концентрация гиалуроновой кислоты в разных участках соединительной ткани неодинакова, особенно много ее в пуповине, стекловидном теле глаза, коже, синовиальной (суставной) жидкости. В этих органах гиалуроновая кислота образует

солеобразные комплексы с протеинами, которые разрушаются в щелочной среде или под действием фермента папаина. Содержание протеина в комплексе 25—30%.

Частичный кислотный гидролиз гиалуроновой кислоты приводит к смеси, в которой преобладает дисахарид гиалобиуроновая кислота — *D*-глюкуронозидо-β-(1→3)-2-амино-2-дезоксиглюкопираноза, выделяемый в виде гидрохлорида:



При гидролизе обнаружен также гидрохлорид *D*-глюкозамина, а среди продуктов ферментативного гидролиза — *D*-глюкуроновая кислота.

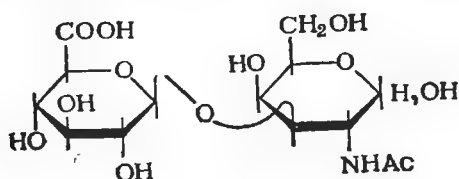
Молекулярная масса гиалуроновой кислоты, полученной из различных источников, составляет $(2,0—2,8) \cdot 10^6$. Данные светорассеяния показали, что молекула гиалуроновой кислоты образует спираль с радиусом 150—400 нм. Ее комплексы с протеинами, выделенные ультрацентрифугированием или электродиализом, имеют молекулярную массу порядка $(8—10) \cdot 10^6$. Эти комплексы сильно гидратированы. Содержание протеина в комплексе достигает 20—30%. Он может быть отделен от полисахарида на ДЭАЭ-сефадексе или разрушением полисахарида гиалуронидазой. По иммунологическому и электрофоретическому поведению протеиновый компонент комплекса близок к α-глобулинам и содержит, по-видимому, примеси β- и γ-глобулинов, однако он отличается от глобулинов плазмы крови. О комплексах гиалуроновой кислоты с альбуминами см. [70].

Гиалуроновая кислота выполняет барьерную функцию: высокая вязкость и наличие активных полярных групп (карбоксильных, гидроксильных, аминогрупп) обеспечивает непроницаемость соединительной ткани для возбудителей болезней.

Под действием фермента гиалуронидазы, расщепляющей гиалуроновую кислоту, происходит ее деполимеризация, следствием чего является снижение вязкости. В результате этого облегчается возможность проникновения различных микроорганизмов в соединительную ткань. Продукты дегполимеризации гиалуроновой кислоты попадают в кровь и влияют на увеличение РОЭ (скорость реакции осаждения эритроцитов). Нарушения обмена гиалуроновой кислоты являются одной из причин болезненных явлений при ревматических артритях, ангиинах, атеросклерозе. Эти патологические явления устраняются при кортизонотерапии, что свидетельствует о контроле обмена гиалуроновой кислоты со стороны гормонов коры надпочечников.

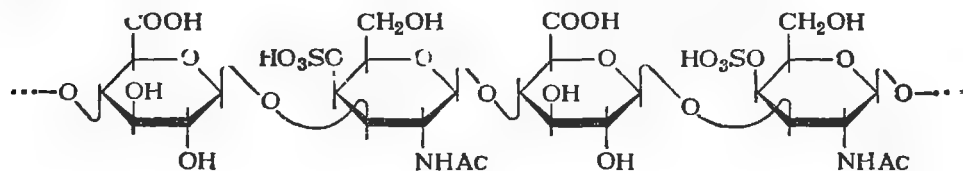
Хондроитинсерные кислоты (хондроитинсульфаты) содержатся в хрящах, коже, костной ткани, трахее, аорте и других органах.

При гидролизе хондроитинсульфатов в гидролизате обнаружен дисахарид хондрозин:

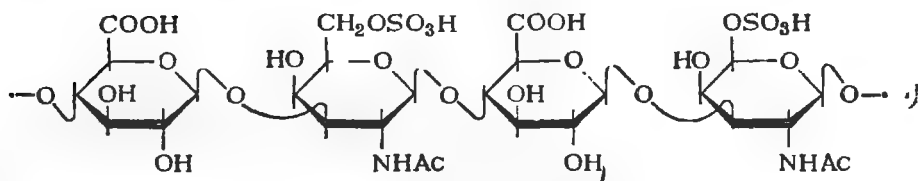


Существует несколько типов хондроитинсульфатов (А, В, С, D), отличающихся между собой строением углеводной части, свойствами, отношением к ферментам [71]. Хондроитинсульфаты А и С содержат полисахариды, состоящие в основном из остатков хондрозина, соединенных β -(1 $\rightarrow$ 4)-гликозидными связями.

Хондроитинсульфаты А и С различаются положением сульфогруппы: в хондроитинсульфате А сульфогруппа находится у гидроксильной группы при С₄ галактозамина, а в хондроитинсульфате С — при С₆:



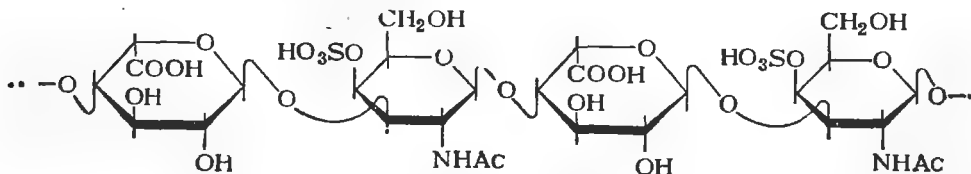
хондроитинсульфат А



хондроитинсульфат С

Имеются данные, что хондроитинсульфат D содержит две сульфогруппы на один остаток хондрозина: при С₆ аминсахара и С₂ или С₃ глюкуроновой кислоты.

Хондроитинсульфат В (β -гепарин, дерматансульфат) содержит вместо D-глюкуроновой кислоты L-идуроновую и сульфирован, по всей вероятности, при С₄ аминсахара:



хондроитинсульфат В

Гиалуронидаза не расщепляет β -гепарин.

Наряду с 2-амино-2-дезоксигалактозамином и уроновыми кислотами в составе хондроитинсерных кислот найдены галактоза, ксилоза, талозамин, а также аминокислоты. На основании анализа продуктов гидролиза хондроитинсульфатов С и А папанином установлено, что тип углевод-пептидной связи в этих полимерах такой же, как в гепарине [65, 72].

Молекулярная масса хондроитинсульфатов (например, С) достигает 55 000. После разрушения папанином выделены фрагменты с молекулярной массой 28 000 и 22 000. Предполагают, что молекулы хондроитинсульфатов состоят из двух полисахаридных цепей, соединенных пептидами. Полисахарид составляет примерно 70% полимера.

Нарушение обмена хондроитинсульфата приводит к кальцификации стенок кровеносных сосудов, понижению их упругости и повышению хрупкости, является одним из факторов развития склероза.

В соединительной ткани обнаружен ряд веществ, близких по строению к хондроитинсерным кислотам. К ним относятся хондроитин, кератосульфат, мукоитинсерная кислота.

Хондроитин отличается от хондроитинсульфатов меньшей степенью сульфирования полисахаридной цепи. Кератосульфат является единственным полисахаридом соединительной ткани, не содержащим урсновых кислот. Он построен из остатков галактозы и 2-ацетиламино-2-дезоксиглюкопиранозы, частично сульфирован. Кератосульфат и хондроитин участвуют в построении основного вещества роговицы. Нарушение обмена этих полисахаридов лежит в основе патологических изменений роговицы.

Мукоитинсерная кислота состоит из эквимольных количеств сульфированных N-ацетилглюкозамина и глюкуроновой кислоты. Она содержится в выделениях пищеварительного тракта, желудочном соке, моче, а также в экстрактах панкреатической железы и плаценты человека.

Гликопротеины

К гликопротеинам относят углевод-белковые комплексы различной структуры, молекулярная масса которых колеблется от нескольких тысяч до нескольких миллионов. Общей чертой гликопротеинов является наличие полипептидной цепи или нескольких цепей, к которым присоединены простетические углеводные группы, имеющие нерегулярное строение. Молекулярная масса олигосахаридных цепочек 512—3 500. Восстанавливающий конец гетеросахаридов соединен O-гликозидной связью с оксиаминокислотами (серин, треонин, оксизин) или N-ацилгликозиламидной связью с аспарагином.

Основное количество гликопротеинов находится в крови млекопитающих. Среди гликопротеинов сыворотки крови обнаружены альбумины и глобулины, в том числе иммуноглобулины, играющие важную роль в создании иммунитета, фибриноген и протромбин, участвующие в процессе свертывания крови, орозомукоид и другие. Содержание углеводов в них составляет от 1 до 40%.

На поверхности эритроцитов находятся так называемые вещества групп крови (группоспецифические вещества крови) — биополимеры, содержащие 70—80% углеводов. Несмотря на это их относят к гликопротеинам, а не к полисахарид-протеинам, учитывая нерегулярность олигосахаридных цепей, их состав (аминосахара, галактоза, фукоза, сиаловые кислоты), разветвленность углеводных цепей и молекулы в целом.

Вещества групп крови выполняют роль «смазки» на поверхности эритроцитов, препятствуя их слипанию, но особенно интересна их роль как антигенов, специфично взаимодействующих с некоторыми белками сыворотки. Антигенные свойства этих веществ определяются структурой олигосахаридных цепей.

Биополимеры с антигенной специфичностью веществ групп крови найдены в других тканях и выделениях организма. Отвечающие за антигенность олигосахаридные цепочки (детерминанты) в этих соеди-

нениях имеют одинаковое строение с детерминантами эритроцитов, и только в общей структуре биополимеров есть различия.

Гликопротеины содержатся также в костях, хрящах, коже, кровеносных сосудах, соединительной ткани, слизистых оболочках. Гликопротеины слизистых оболочек и выделений желез часто называют муцинами или сиаломуцинами. Они предохраняют слизистые оболочки от механических повреждений, а также выполняют иммунную функцию. Сиалосодержащие гликопротеины ингибируют агглютинацию эритроцитов вирусом гриппа. Гликопротеинами являются некоторые гормоны и ферменты (эритропоэтин, тиреотропин, гонадотропный гормон, холинэстераза сыворотки крови, рибонуклеаза В из панкреатического сока и др.).

Гликопротеины плазмы крови. Плазма крови представляет собой вязкий водный раствор (90%-ный), содержащий целый ряд соединений (глобулинов), которые являются гликопротеинами. Углевод-белковые соединения плазмы крови обуславливают такие функции плазмы, как регулирование осмотического давления, транспорт водонерастворимых веществ, иммунохимические свойства, свертываемость. Многие гликопротеины плазмы крови выделены, исследуются их строение и биологические свойства. Сложная смесь этих веществ может быть разделена на индивидуальные при помощи иммуноэлектрофореза. Некоторые гликопротеины плазмы крови приведены в табл. 5.

Т а б л и ц а 5. Некоторые гликопротеины плазмы крови

Название	Концентрация в крови, г/л	Молекуляр- ная масса	Состав углеводной части
α -Глобулины	3		
Орозомукоид (α_1 -кислый гликопротеин)	0,5	45 000	Gal, Man, HexNAc, Fuc, NANA
α_1 -Липопротеин	2,0	200 000	HexNAc, Fuc, NANA
α_2 -Глобулины	7		
Церулоплазмин	0,3	150 000	Gal, Man, Glc, GlcNAc
α_2 -Липопротеин	0,2	—	—
Гаптоглобин	1	100 000	Fuc, Gal, Man
β -Глобулины	11		
Трансферрин	2,5	90 000	Hex
β -Липопротеин	4,0	1 300 000	HexNAc
Протромбин	0,1	62 700	
γ_1 -Глобулины	5		
Фибриноген	3	330 000	HexNAc, Hex, NANA
γ_2 -Глобулины	9	150 000	

Углеводная часть гликопротеинов плазмы крови характеризуется большим разнообразием моносахаридов. Среди них найдены галактоза, манноза, фукоза, гексозамины. В состав подавляющего большинства изученных в настоящее время гликопротеинов входят сиаловые кислоты, например орозомукоид содержит 9—12% сиаловых кислот, α -гликопротеин — до 6%.

Глобулины играют важную роль в создании защитных сил организма путем образования антител. Установлено, что в α -фракции находятся противотифозные О-агглюти-

нины, а в β -фракции — N-агглютинины. Противогриппозные антитела найдены в β_2 -фракции. В фракции между β_2 - и γ - обнаружен дифтерийный антитоксин. Наиболее богаты антителами γ -глобулины: найдены противострептококковые, противоокклюзные, противополиомиелитные, противогепатитные антитела, столбнячный антитоксин и др. Макроглобулины ответственны за неспецифический иммунитет организма.

Патологические состояния организма влияют на уровень содержания этих веществ и их состав. Отмечено, что при болезненных нарушениях содержание углеводов-белковых веществ в крови повышается, что можно количественно оценить по возрастанию уровня гексозаминов и других моносахаридов. Такого рода отклонения наблюдаются при раке желудка, яичников, легких, саркомы ретикулярных клеток, лимфатической лейкемии, воспалении легких, туберкулезе, остром ревматизме, менингококковой бактеремии, инфаркте миокарда и др. Определение изменений в качественном и количественном составе глобулинов может использоваться в диагностике ряда заболеваний.

Кроме приведенных в табл. 5 веществ ряда выделены и другие гликопротеины плазмы, например гормон эритропоэтин, стимулирующий образование эритроцитов. Он содержит 35% углеводов: 19,5% (от общего содержания углеводов) гексоз, 9% гексозаминов, 1% фукозы, 14% сиаловых кислот. В крови найден гликопротеин пропердин, играющий важную роль в инаktivации бактериальных клеток.

Строение большинства гликопротеинов плазмы крови, особенно их углеводных фрагментов, изучено мало. Известны данные об общем содержании углеводов в гликопротеинах и числе олигосахаридных цепей в молекулах. Из ряда гликопротеинов после деструкции ферментами были выделены гликопептиды. При изучении гликопептидов, выделенных из γ -глобулина, трансферрина и церулоплазмينا, показано, что связь между углеводами и пептидами осуществляется через аспарагиновую кислоту [73].

Наиболее изученным гликопротеином плазмы крови является орозомукоид (α_1 -кислый гликопротеин). Он найден в крови человека, быка, лошади, свиньи и др. Содержание углеводов в нем 40—41% [74].

Сходное строение с орозомукоидом имеет α -глобулин, выделенный из плазмы крови теленка, — фетуин. Его молекулярная масса 45 000—49 700. Некоторые детали строения фетуина выяснены в результате ферментативного и частичного кислотного гидролиза. Под действием нейраминидазы или 0,25 н. серной кислоты (80 °C 1 ч) отщепляются сиаловые кислоты. При более жестком кислотном гидролизе гликопептида, полученного деструкцией фетуина протеолитическими ферментами, выделен дисахарид:

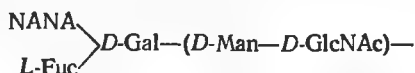


Углеводная часть фетуина имеет разветвленную структуру, в которой каждое разветвление представляет собой трисахарид



присоединенный к внутреннему участку, содержащему лактозу и N-ацетилгексозамин. N-Ацетилгексозамин, по-видимому, включается в связь с протеином.

Гликопептиды выделены также при ферментативном расщеплении одного из γ -глобулинов человека. Среди них идентифицирован гликопептид, содержащий олигосахаридную цепь



связанную с пептидами через N-ацетилглюкозамин и аспарагиновую кислоту. Установлены последовательности аминокислот в пептидах, связанных с этими олигосахаридами:

у быка Glu—GluNH₂—Phe—Asp—углевод
у человека AspNH₂—(Tyr, Glu)—Asp—углевод
у кролика GluNH₂—GluNH₂—Phe—Asp—углевод

Молекулярная масса гликопептидов, полученных при расщеплении фибриногена проназой, составляет около 2300. По-видимому, в состав фибриногена входит 6—7 олигосахаридных цепей. Гликопептиды содержат сиаловую кислоту, галактозу, маннозу, глюкозамин. По предварительным данным, связь углеводной части с белковой осуществляется через аспарагин.

Гликопротеины группоспецифических веществ крови. Одной из наиболее изученных антигенных систем организма являются эритроциты. Поверхность эритроцитов покрыта веществами, обуславливающими групповую специфичность. Каждой группе крови присущи вещества вполне определенной структуры. Они являются комплексами полисахаридов, белков и, в ряде случаев, липидов и называются агглютиногенами. За групповую специфичность ответственны отдельные участки гетерополисахаридных цепей.

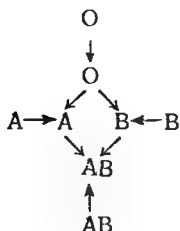
Ландштейнером в 1900 г. были открыты группы крови А, В, АВ, О. На поверхности эритроцитов крови этих групп находятся соответственно вещества А, В, А и В, Н [75]. В плазме крови находятся специфические антитела, называемые агглютинидами. В пределах одной группы агглютиногены и агглютинины не взаимодействуют, однако при смешивании различных групп крови, например А и В, образуется комплекс агглютиноген — агглютинин. При этом исчезают заряды на поверхности эритроцитов, эритроциты склеиваются (агглютинируют) и разрушаются. Вещество А взаимодействует с веществом анти-А, а вещество В — с веществом анти-В.

Специфичность биополимеров групп крови определяется особенностями их строения и конформации, которые позволяют агглютиногенам реагировать с образованием комплекса (серологически активные) или оставаться нейтральными по отношению к агглютинидам сыворотки (серологически неактивные).

Ниже приведены группы крови системы АВО и возможные комбинации при переливании крови:

Группы крови	Антигены (агглютиногены на поверхности эритроцитов)	Антитела (агглютинины в сыворотке)
А	А	анти-В (β)
В	В	анти-А (α)
АВ	А и В	—
О	Н	анти-А, анти-В (α, β)

Схема переливания крови



Как следует из схемы, люди с группой крови О являются универсальными донорами, а с группой крови АВ — универсальными реципиентами. Введение с кровью группы О при вливании ее обладателям других групп небольшого количества антител не представляет опасности.

В настоящее время известны 14 самостоятельных систем групп крови (М, N, S и др.), включающих более 60 различных антигенов. С системой АВО сходна система Льюиса.

Эритроциты могут содержать особый антиген Rh, так называемый резус-фактор. Всех людей по наличию или отсутствию этого антигена можно разделить на резусположительных и резусотрицательных. При случайном введении крови с положительным «резус-фактором» людям, у которых резус-фактор отсутствует, у них вырабатываются антитела (антирезус-агглютинины). Повторное введение таким людям резусположительной крови может привести к тяжелым последствиям.

Группы крови могут быть установлены с помощью специфических иммунных сывороток, препаратов агглютининов, которые получают из семян некоторых растений или сыворотки крови. Реакции взаимодействия веществ групп крови и сывороток очень избирательны, они широко используются в медицине, судебной медицине, антропологии. С их помощью удалось определить группы крови даже мумий Древнего Египта, Мексики, Перу.

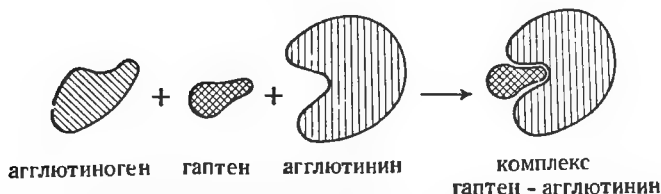
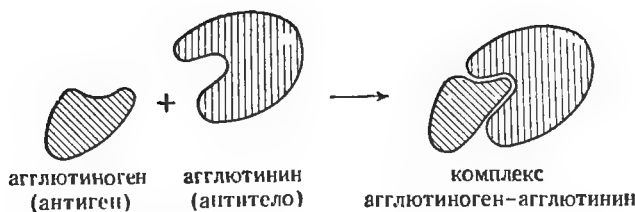
Вещества групп крови не могут быть экстрагированы с поверхности эритроцитов водой или солевыми растворами, но удаляются органическими растворителями. Эти биополимеры представляют собой гликопротеид-липидные комплексы, содержащие сфингозин и жирные кислоты.

Вещества с антигенными свойствами обнаружены не только в эритроцитах, но и на поверхности клеток тканей, а также в составе различных тканевых жидкостей и секретов желез: в слюне, желудочном соке, желчи, слезах, моче, меконии, жидкости кисты яичника и т. д. Агглютиногены тканевых жидкостей и секретов растворимы в воде и состоят из углеводов и аминокислот. Эти вещества и явились объектом для изучения строения и установления зависимости между химической структурой и биологической активностью. Вещества с антигенной активностью найдены также в оболочках микроорганизмов. С их существованием связана проблема несовместимости тканей при пересадке органов.

Водорастворимые группоспецифические вещества крови представляют собой ковалентно связанные углевод-белковые биополимеры, которые содержат 80—90% углеводов. Среди аминокислот преобладают серин, треонин, пролин и аланин. Ароматические аминокислоты и аминокислоты, содержащие серу, практически отсутствуют. В состав полисахаридной компоненты входят *L*-фукоза, *D*-галактоза, *N*-ацетилглюкозамин, *N*-ацетилгалактозамин, сиаловые кислоты. Количественное соотношение различных моносахаридов мало отличается у разных групп. Молекулярная масса группоспецифических веществ составляет $0,26 \div 1,8 \cdot 10^6$.

В последнее время получено много данных о тонкой структуре углеводной части веществ групп крови и о природе детерминантных группировок. Основными путями исследования явились: изучение ингибирования агглютинации эритроцитов различными моно- и олигосахаридами, ферментативный гидролиз и, наконец, выделение и идентификация фрагментов с антигенной активностью, полученных частичным кислотным гидролизом веществ групп крови.

Еще Ландштейнер отметил, что вещества со структурой, близкой или идентичной структуре детерминанты антигена (гаптены), могут соединяться с антителом. Они конкурируют с антигенами и подавляют реакцию между антигеном и антителом:



Чем меньше концентрация гаптена, необходимая для ингибирования, тем ближе его структура к структуре детерминанты. Реакции ингибирования агглютинации веществ групп крови изучены Кабатом.

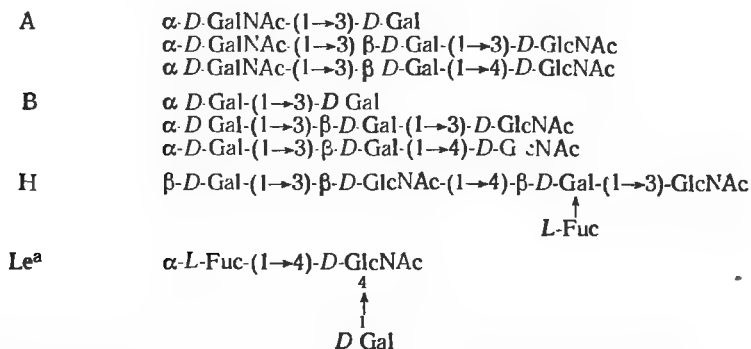
Важнейшим шагом к изучению детерминантных структур веществ групп крови явилось исследование кислотного и щелочного гидролиза этих биополимеров. В слабокислой среде происходит отщепление сиаловых кислот и фукозы; гидролиз 1 н. уксусной кислотой в течение 16 ч при 100 °С приводит к отщеплению 95% всей фукозы. Это свидетельствует, что остатки сиаловой кислоты и фукозы в углеводных цепях являются концевыми или образуют разветвления.

При гидролизе минеральными кислотами из гидролизатов веществ А, В, Н, Le^a выделены и идентифицированы олигосахариды, обладающие антигенной активностью этих групп, а также ряд серологически неактивных веществ. Олигосахариды, обладающие активностью, специфичны для каждой группы крови; неактивные фрагменты одинаковы для всех групп крови:

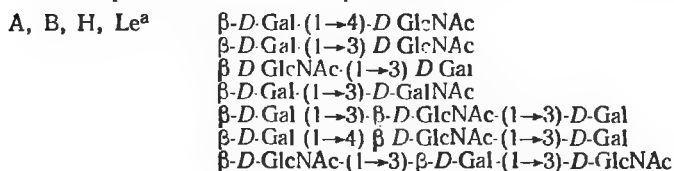
Группоспецифические вещества крови

Олигосахариды, выделенные из гидролизатов

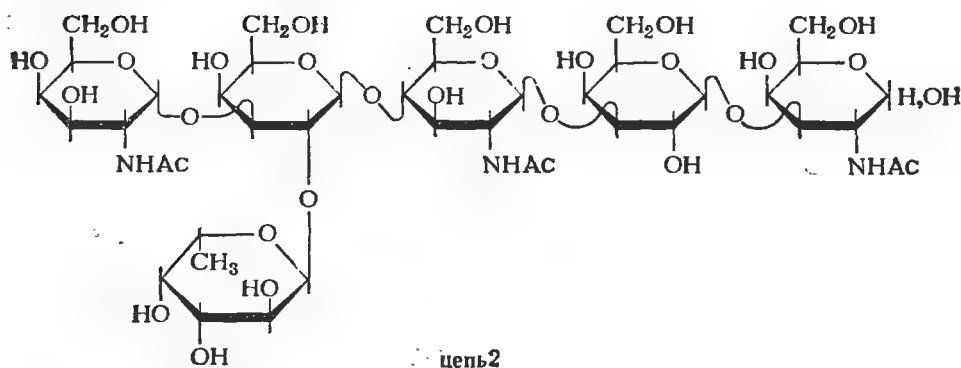
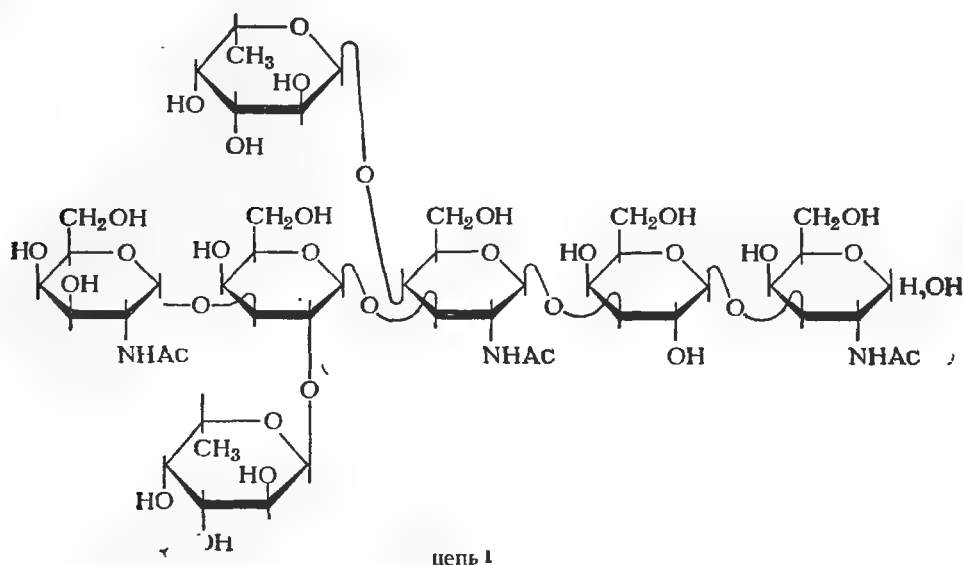
Серологически активные



Не проявляющие серологической активности



Результаты ферментативного и щелочного гидролиза антигенов А, Н, Le^a позволили выяснить ряд деталей их строения [76]. Для группового вещества А определена структура двух серологически активных олигосахаридов:

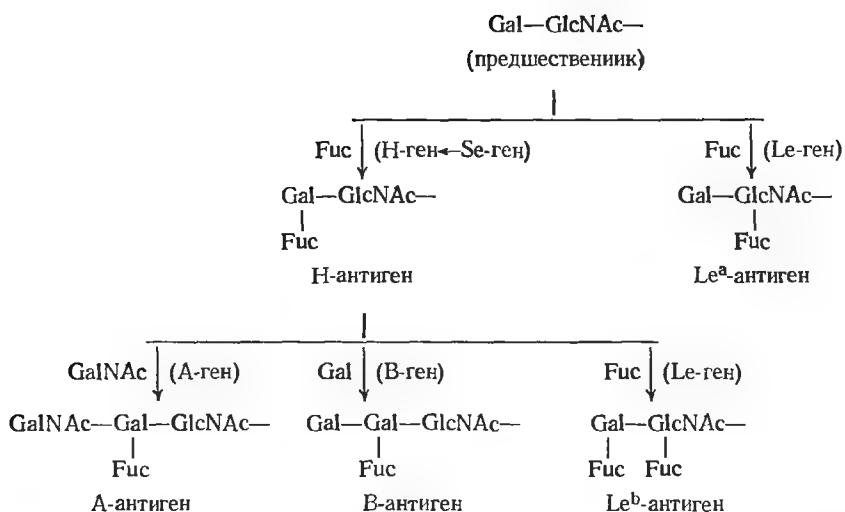


Биосинтез групповых веществ крови осуществляется под генетическим контролем. Механизм этого процесса пока не выяснен, но можно предполагать, что все групповые вещества крови синтезируются из общего предшественника [77] (см. стр. 97).

Как указывалось выше, групповые вещества крови системы АВО могут находиться в растворимой форме в тканевых жидкостях и секретах. Люди, способные выделять в растворимом состоянии антигены А, В и Н, называются «секреторами» в отличие от «несекреторов», не выделяющих эти вещества.

Секреция антигенов связана также с другой системой крови — системой Льюиса, характеризующейся присутствием антигенов Le^a и Le^b.

Способность секретировать антигены А и В является доминантным наследственным признаком и контролируется парой аллельных генов Se и se. Ген Se определяет способность к секреции, а его аллель se (в двойной дозе) — отсутствие секреции.



Синтез Н-специфических веществ контролируется независимой системой генов H и h. Ген H ответственен за синтез группового вещества H, а его аллель h (в двойной дозе) определяет отсутствие антигена H.

Система Льюиса контролируется генами Le и le, которые наследуются независимо от генов ABO или Hh. Индивидуумы, имеющие ген Le^a, не секретируют групповые вещества A, B и H. Антиген Le^b может присутствовать вместе с антигенами A, B, H и Le^a. В связи с этим сделано предположение, что Le^b-антиген является продуктом взаимодействия генов H и Le.

Таким образом, в тканевых жидкостях и секретах могут обнаруживаться в растворимой форме пять групповых веществ — A, B, H, Le^a и Le^b, являющихся продуктами трех независимых систем генов ABO, Hh и Lele.

Сиаломуцины подчелюстных желез. Различные железы млекопитающих секретируют большое количество вязких жидкостей, которые содержат углеводы, богатые сиаловыми кислотами, и ингибируют агглютинацию эритроцитов вирусами.

Сиаломуцины подчелюстных желез выделяют экстракцией при pH 9, осаждают цетавлоном, а затем очищают фракционированием из разбавленных спиртовых растворов. Электрофоретически однородный сиаломуцин быка содержит 24,8—31,6% сиаловой кислоты и 18,6% N-ацетилгалактозамина. В щелочной среде большая часть простетических олигосахаридных групп отщепляется. После диализа, очистки хроматографией, гидролиза и последующего периодатного окисления показано, что эти простетические группы представляют собой дисахариды, присоединенные к протеину. Число таких групп в сиаломуцине около 800. Эти гликопротеины представляют собой важный объект для изучения характера связи между олигосахаридами и аминокислотами. Большая часть этих связей — гликозидно-эфирная, между гидроксильной группой аминокислоты и оксиаминокислотами. Эти связи разрушаются при обработке щелочью или гидроксидом натрия. Однако такое расщепление освобождает только 80% всей сиаловой кислоты сиаломуцина, что указывает на существование связей, устойчивых в щелочной среде [37].

Сиаловая кислота сиаломуцинов подчелюстных желез удаляется нейраминидазой. N-Ацетилгалактозамин может быть отщеплен от гликопептидов, полученных деструкцией сиаломуцинов нейраминидазой и трипсином, действием N-ацетил-β-D-гексозаминидазы.

1. Кочетков Н. К. и др. Химия углеводов. М., «Химия», 1967. 671 с.
2. Stoddart J. F., Stereochemistry of Carbohydrates. N. Y., Wiley — Interscience, 1971. 232 p.
3. Stanek J. e. a. The Monosaccharides. Prague, Publishing House of the Czechoslovak Academy of Sciences, 1963. 1006 p.
4. Henseke G. Zuckerchemie. Eine Einführung. Berlin, Akademie Verlag, 1966. 167 S.
5. Davidson E. A. Carbohydrate Chemistry. N. Y., Holt, Rinehart a. Winston, 1967. 441 p.
6. Моррисон Дж., Мошер Г. Асимметрические органические реакции. Пер. с англ. Под ред. Е. И. Клабуновского. М., «Мир», 1973. 508 с.
7. Иллиел Э. и др. Основы стереохимии. Под ред. Э. Иллиел. Пер. с англ. Под ред. В. М. Потапова. М., «Мир», 1971. 107 с.
8. Jeffrey G. A., Kim H. S., Carbohydrate Res., 1970, v. 14, № 2, p. 207—216; Jeffrey G. A., Fasiska E. J., Carbohydrate Res., 1972, v. 21, № 2, p. 187—199.
9. Horton D., Miller M. J., J. Org. Chem., 1965, v. 30, № 7, p. 2457—2459; Horton D., Wander J. D., Carbohydrate Res., 1969, v. 10, № 2, p. 279—288.
10. The Carbohydrates. Chemistry and Biochemistry. Eds. W. Pigman, D. Horton. New York — London, Acad. Press. v. IA, 1972, 642 p.; v. IIA, 1970, 469 p.; v. IIB, 1970, 853 p.
11. Reeves R. E., J. Am. Chem. Soc., 1949, v. 71, № 5, p. 1737—1741.
12. Isbell H. S., Tipson R. S., Science, 1959, v. 130, № 3378, p. 793—794; Guthrie R. D., Chem. Ind., 1958, № 48, p. 1593—1594; Shaw D. F., Tetrahedron Lett., 1965, № 1, p. 1—4.
13. Foster A. B. e. a., J. Chem. Soc., 1963, p. 4471—4477.
14. Anet E. F. L. J., Carbohydrate Res., 1968, v. 8, № 2, p. 164—174.
15. J. Org. Chem., 1963, v. 28, № 1, p. 281—291; Справочник химика. Дополнительный том. Изд. 2-е. Л., «Химия», 1968. 507 с.
16. Mills J. A., Adv. in Carbohydrate Chem., 1956, v. 10, p. 1—53.
17. Mazurek M., Perlín A. S., Can. J. Chem., 1965, v. 43, № 7, p. 1918—1923.
18. Kochetkov N. K., Khorlin A. J., Bochkov A. F., "Tetrahedron", 1967, v. 23, № 2, p. 693—707.
19. Newth F. H., Adv. in Carbohydrate Chem., 1951, v. 6, p. 83—106.
20. Speck J. C., Adv. in Carbohydrate Chem., 1958, v. 13, p. 63—103.
21. Методы химии углеводов. Пер. с англ. Под ред. Н. К. Кочеткова. М., «Мир», 1967. 512 с.
22. Tipson R. S. Infrared Spectroscopy of Carbohydrates. U. S. Department of commerce National Bureau of Standards, 1968. 110 p.
23. Ferrier R. J., Collins P. M. Monosaccharide Chemistry. London, Great Britain William Clowes a. Sons Limited, Colchester and Beceles Set in JBM Press Roman, 1972. 318 p.
24. Anet F. A. L., Bourn A. J. R., J. Am. Chem. Soc., 1965, v. 87, № 22, p. 5250—5251.
25. Kennedy G. R., How M. J., Carbohydrate Res., 1973, v. 28, № 1, p. 13—19.
26. Dorman D. E., Roberts J. D., J. Am. Chem. Soc., 1970, v. 92, № 5, p. 1355—1361.
27. Gorin P. A. J., Mazurek M., Carbohydrate Res., 1973, v. 27, № 2, p. 325—339.
28. Kochetkov N. K., Chizhov O. S., Adv. in Carbohydrate Chem., 1966, v. 21, p. 39—93.
29. Biemann K., De Jongh D. C., Schnoes H. K., J. Am. Chem. Soc., 1963, v. 85, № 12, p. 1763—1771.
30. Guerrero J., Weill C. E., Carbohydrate Res., 1973, v. 27, № 2, p. 471—474.
31. Beychok S., Kabat E. A., Biochemistry, 1965, v. 4, № 12, p. 2565—2574.
32. Craig D. C., Stephenson N. C., Stevens J. D., Carbohydrate Res., 1972, v. 22, № 2, p. 494—495.
33. Хайс И. М., Мацек К. Хроматография на бумаге. Пер. с чешск. Под ред. М. Н. Запрометова. М., «Наука», 1962. 851 с.
34. Шталь Э. Хроматография в тонких слоях. Пер. с нем. Под ред. К. В. Чмутова. М., «Мир», 1965. 508 с.
35. Kircher H. W., Anal. Chem., 1960, v. 32, № 9, p. 1103—1106; Bishop C. T., Adv. in Carbohydrate Chem., 1964, v. 19, p. 95—147.
36. Stanek J., Černý M., Pacák J. Oligosacharidy. Praha, Nakladatelství Československé Akademie Věd., 1962. 357 p.
37. Murty V. L. H., Horowitz M. I., Carbohydrate Res., 1968, v. 6, № 3, p. 266—275.
38. J. Chem. Soc., 1962, p. 5307—5312.
39. Biochemistry, 1966, v. 5, № 5, p. 1445—1453.
40. Bentley R., J. Am. Chem. Soc., 1959, v. 81, № 8, p. 1952—1956.
41. Wunderlich J., C. r., 1955, v. 240, № 12, p. 1350—1352.

42. Kochetkov N. K., Khorlin A. J., Bochkov A. F., "Tetrahedron", 1967, v. 23, № 2, p. 693—707.
43. Micheel F., Drescher E., Chem. Ber., 1958, v. 91, № 3, p. 670—672.
44. Хорлин А. Я. и др., Изв. АН СССР. Сер. хим., 1968, т. 8, № 1, с. 227.
45. Frechet M., Schuerch C., J. Am. Chem. Soc., 1971, v. 93, № 2, p. 492—496; Guthrie R. D., Jenkins A. D., Stehlicek J., J. Chem. Soc. (C), 1971, № 15, p. 2690—2696.
46. Химия биологически активных природных соединений. Под ред. Н. А. Преображенского, Р. П. Евстигнеевой, М., «Химия», 1970. 512 с.
47. Gagnaire D. J., Vottero J. A., Carbohydrate Res., 1973, v. 28, № 1, p. 165—170.
48. Eby R., Schuerch C., Carbohydrate Res., 1973, v. 27, № 1, p. 63—72.
49. Whistler R. L., Smart C. L. Polysaccharide Chemistry. N. Y. Academic Press, 1953. 493 p.; Horton D., Wolf from M. L. In: Comprehensive Biochemistry. V. 5. Eds. M. Florin, E. N. Stolz, Amsterdam, Elsevier, 1963. 327 p.
50. Стейси М., Баркер С. Углеводы живых тканей. Пер. с англ. Под ред. Н. К. Кочеткова. М., «Мир», 1965. 324 с.
51. Розенфельд Е. Л., Усп. биол. хим., 1958, т. 3, с. 369—387.
52. Степаненко Б. Н., «Успехи химии», 1959, т. 28, № 5, с. 521—542.
53. Ленинджер А. Биохимия. Пер. с англ. Под ред. А. А. Баева, Я. М. Варшавского. М., «Мир», 1974. 957 с.
54. Малер Г., Кордес Ю. Основы биологической химии. Пер. с англ. Под ред. А. А. Баева, Я. М. Варшавского. М., «Мир», 1970. 567 с.
55. Девис Д., Джованелли Дж., Рис Т. Биохимия растений. Пер. с англ. Под ред. В. Л. Кретьова. М., «Мир», 1966. 512 с.
56. Гликопротеины. Т. I. Под ред. А. Готтшалка. Пер. с англ. Под ред. В. А. Деревицкой. М., «Мир», 1969. 304 с.
57. Meyer K. Adv. in Protein Chem., 1945, v. 2, p. 249—275.
58. Jeanloz R. W., Arthritis Rheumat., 1960, v. 3, № 3, p. 233—237.
59. Gottschalk A. Perspectives Biol. Med., 1962, v. 5, № 3, p. 327—337.
60. Huang C. C., Mayer H. E., Montgomery R., Carbohydrate Res., 1970, v. 13, № 1, p. 127—137.
61. Кочетков Н. К., Чижов О. С., Свиридов А. Ф., Изв. АН СССР. Сер. хим., 1967, № 10, с. 2316—2320.
62. Lloyd L. O., Beychok S., Kabat E. A., "Biochemistry", 1967, v. 6, № 5, p. 1448—1454; Lloyd L. O., Kabat E. A., Licerio E., "Biochemistry", 1968, v. 7, № 8, p. 2976—2990.
63. Hough L., Jones J. V. S., Wusteman P., Carbohydrate Res., 1972, v. 21, № 1, p. 9—17.
64. Bogdanov V. P., Kawersneva E. D., Andrejeva A. P., Biochim. Biophys. Acta, 1964, v. 83, № 1, p. 69—73.
65. Roden L., Armand G., J. Biol. Chem., 1966, v. 241, № 1, p. 65—70; Bray B. e. a., J. Biol. Chem., 1967, v. 242, № 14, p. 3373—3380.
66. Lineback D. R., Carbohydrate Res., 1968, v. 7, № 1, p. 106—108.
67. Berkorovainy A., Grohlich D., Biochem. J., 1969, v. 115, № 4, p. 817—822.
68. Wolf from M. L., Wang P. Y., Chem. Comm., 1967, № 5, p. 241—242; Wolf from M. L., Wang P. Y., Honda S., Carbohydrate Res., 1969, v. 11, № 1, p. 179—185.
69. Perlín A. S., Sanderson G. R., Carbohydrate Res., 1970, v. 12, № 2, p. 183—192.
70. Niedermeier W., Gramling E. S., Carbohydrate Res., 1968, v. 8, № 3, p. 317—327.
71. Mathews M. B., Decker L., Biochim. Biophys. Acta, 1968, v. 156, № 2, p. 419—421.
72. Lindahl U., Roden L., J. Biol. Chem., 1966, v. 241, № 9, p. 2113—2119.
73. Milstein C., Nature, 1967, v. 209, № 5021, p. 370—373.
74. Sato T. e. a., Carbohydrate Res., 1967, v. 5, № 3, p. 387—398.
75. Бойд В. Введение в иммунохимическую специфичность. М., Издательский, 1963. 186 с.
76. Lloyd K. O., Kabat E. A., Carbohydrate Res., 1969, v. 9, № 1, p. 41—48; Kochetkov N. K. e. a., Carbohydrate Res., 1970, v. 12, № 3, p. 437—447; Деревицкая В. А. и др., Изв. АН СССР. Сер. хим., 1970, № 9, с. 2067—2073; Lundblad A., Svensson S., Carbohydrate Res., 1973, v. 30, № 1, p. 187—189.
77. Nubertus von N. Untersuchungen zur biologischen Funktions Sialinsäure-haltiger Oligosaccharide aus Fragmentmilch. Bonn, Inaug — Diss., 1971. 128 S.

II. ХРОМОПРОТЕИДЫ

К хромопротеидам относят сложные белки, состоящие из белковой части и окрашенной простетической группы. Естественно, что в эту группу соединений попадают вещества, отличающиеся как по химической структуре, так и по роли, которую они играют в живом организме (флавопротеиды, гемопротеиды, ретинилиденпротеиды и другие).

Важнейшие физиологические функции в живой клетке выполняют профиринсодержащие хромопротеиды — гемопротеиды и хлорофилл. Гемопротеиды участвуют в клеточном дыхании, хлорофилл — в фотосинтезе. Несмотря на кажущееся различие этих двух процессов, общим для них является проблема транспорта электронов и сопряженного с ним фосфорилирования, в одном случае окислительного, в другом — фотосинтетического.

Гемопротеиды — сложные белки, имеющие в качестве простетических групп железопорфирины. Наиболее хорошо изученный представитель их, гемоглобин, обладает способностью обратимо связываться с кислородом и, входя в состав крови, выполняет в организме роль переносчика кислорода. Миоглобин также способен к обратимому соединению с кислородом и играет роль кратковременного резерва кислорода в мышцах. Гемсодержащие ферменты — каталаза и пероксидаза — катализируют разложение перекиси водорода. Цитохромы, являющиеся переносчиками электронов, участвуют во всех окислительно-восстановительных реакциях, протекающих в живой клетке.

В основе хлорофилла лежит магнийпорфириновая структура, обеспечивающая его эффективное участие в процессе фотосинтеза.

В последние годы полностью установлено строение молекул гемоглобина и миоглобина, а также некоторых других гемопротеидов, в частности цитохрома с.

Сейчас уже стала ясной не только статика этих сложных молекул, не только их строение, но и динамика, механизм возникновения и процесс распада в организме. Довольно хорошо изучены и продукты распада порфириновой части молекул — желчные пигменты.

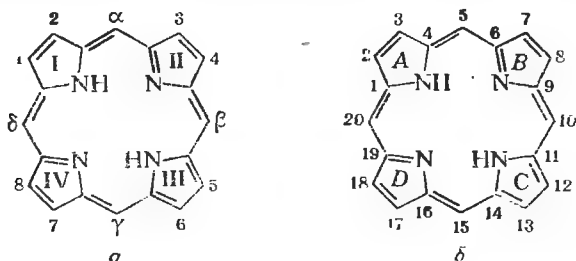
Выяснение деталей структуры гемопротеидов помогает не только разрешить вопрос о соотношении строения и функции этих биологически важных соединений, но и подойти к решению проблем более общего характера, например таким, как изучение генетического контроля над синтезом белка или вопросы эволюции белка.

В настоящей главе рассмотрены лишь важнейшие и наиболее хорошо изученные представители хромопротеидов — гемопротеиды, хлорофилл-белковые комплексы и ретинилиденпротеиды.

Прежде чем перейти к знакомству с отдельными представителями гемопротеидов, целесообразно рассмотреть некоторые аспекты химии порфиринов.

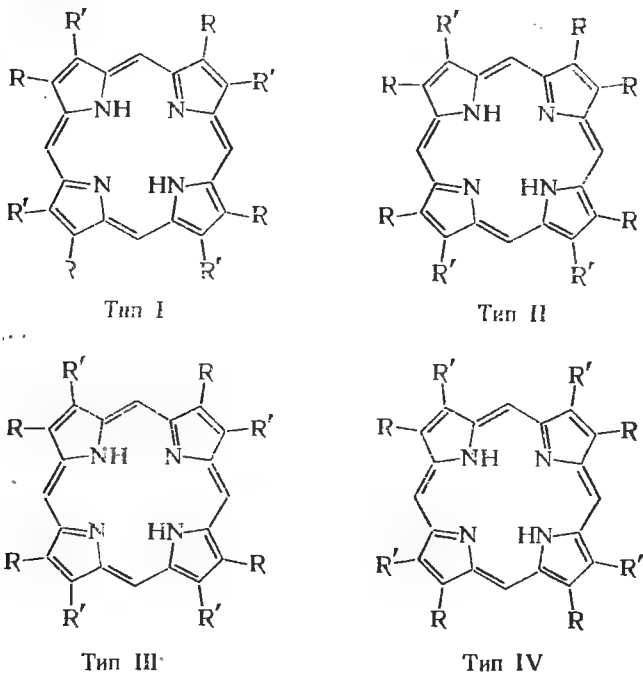
ПОРФИРИНЫ

В основе химической структуры порфиринов лежит порфин — двадцатичленный ароматический макроцикл, состоящий из четырех пиррольных колец, соединенных моноуглеродными мостиками. Нумерация углеродных атомов у производных порфина по системе Фишера (а) [1] и номенклатуре IUPAC (б) [2] представлена ниже:



ИЗОМЕРИЯ В РЯДУ ПОРФИРИНОВ

Уже для простейшего производного порфина — этиопорфирина, несущего заместители двух типов ($R = \text{CH}_3$ и $R' = \text{C}_2\text{H}_5$), возможны четыре изомера при условии, что каждое пиррольное кольцо содержит одну метильную группу:



По четыре изомера имеют также копрпорфирин ($R = \text{CH}_3$, $R' = \text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$) и урпорфирин ($R = \text{CH}_2\text{COOH}$, $R' = \text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$).

В природе встречаются исключительно порфирины типа III, например копропорфирин III и уропорфирин III, и гораздо реже, в некоторых патологических случаях, — порфирины типа I, например копропорфирин I и уропорфирин I.

Гораздо большее число изомеров имеют порфирины, содержащие три различных типа заместителей. Так, для мезопорфина (4CH_3 , $2\text{C}_2\text{H}_5$ и $2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$ -группы) их 15. По пятнадцать изомеров имеют протопорфирин и гематопорфирин. Однако природные соединения — протопорфирин IX, мезопорфирин IX и гематопорфирин IX — относятся к типу III и могут быть превращены в этиопорфирин III.

Тривиальные названия некоторых природных и производных от них порфиринов приведены в табл. 6.

Таблица 6. Тривиальные названия некоторых порфиринов

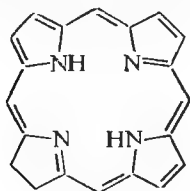
Название порфина	Заместители в положениях (нумерация согласно а)*							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Протопорфирин IX	Me	V	Me	V	Me	P	P	Me
Мезопорфирин IX	Me	Et	Me	Et	Me	P	P	Me
Гематопорфирин IX	Me	CHCH_3 OH	Me	CHCH_3 OH	Me	P	P	Me
2,4-Диацетилдейтеропорфирин IX	Me	Ac	Me	Ac	Me	P	P	Me
Дейтеропорфирин IX	Me	H	Me	H	Me	P	P	Me
Этиопорфирин III	Me	Et	Me	Et	Me	Et	Et	Me
Копропорфирин III	Me	P	Me	P	Me	P	P	Me
Уропорфирин III	A	P	A	P	A	P	P	A
Хлорокруоропорфирин	Me	CHO	Me	V	Me	P	P	Me
Пемптопорфирин	Me	H	Me	V	Me	P	P	Me
Родопорфирин XV	Me	Et	Me	Et	Me	COOH	P	Me
Пирропорфирин XV	Me	Et	Me	Et	Me	H	P	Me
Филлопорфирин**	Me	Et	Me	Et	Me	H	P	Me
Цитодейтеропорфирин	Me	H	Me	H	Me	P	P	H

* Me=CH₃, Et=C₂H₅, Ac=COCH₃, A=CH₂COOH, P=CH₂CH₂COOH, V=CH=CH₂.

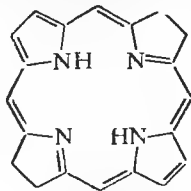
** Кроме указанных заместителей имеет в γ-положении метильную группу.

ВОССТАНОВЛЕННЫЕ ФОРМЫ ПОРФИРИНОВ

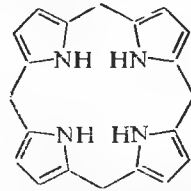
Порфиновое ядро относительно легко восстанавливается, давая различные гидропорфины. В основе хлорофиллов лежит дигидропорфин — хлорин. Бактериохлорофилл является производным тетрагидропорфина — бактериохлорина. Замещенные хлорины и бактериохлорины относительно устойчивы, для окисления их в порфирины необходимы довольно энергичные окислители. Порфириногены, производные гексагидропорфина, являются биогенетическими предшественниками порфиринов и легко превращаются в последние при окислении.



хлорин

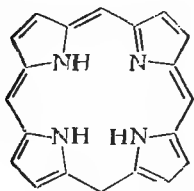


бактериохлорин

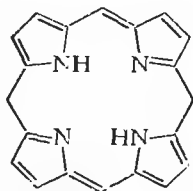


гексагидропорфин

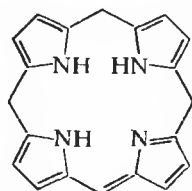
Кроме этих довольно широко распространенных в природе восстановленных форм известны другие, менее устойчивые: дигидропорфирины — флорины и порфодиметены — промежуточные продукты, образующиеся при синтезе порфиринов, и тетрагидропорфирины — порфометены, возникающие в процессе окисления порфириногенов в порфирины.



флорин



порфодиметен



порфометен

Возможно, что эти лабильные соединения играют важную роль в биологических процессах.

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ПОРФИРИНОВ

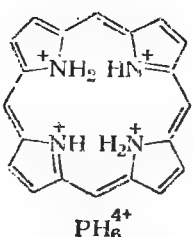
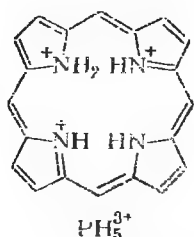
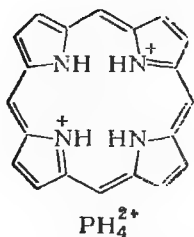
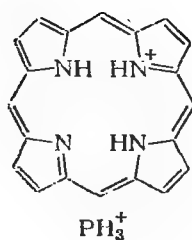
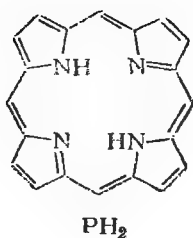
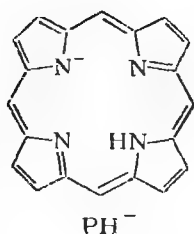
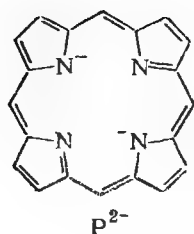
Система сопряженных двойных связей делает порфиновое ядро очень устойчивым и обуславливает характерную окраску его производных, благодаря которой они получили свое название.

Все природные порфирины являются высокотеплостойкими веществами, хорошо растворимыми в уксусной кислоте, минеральных кислотах, пиридине, диоксане и гораздо хуже — в спиртах, ацетоне и эфире.

Природные порфирины содержат карбоксильные группы и являются амфотерными соединениями, растворимыми как в кислотах, так и в водных растворах щелочей, из которых они могут быть осаждены при доведении pH до изоэлектрической точки (pH 3—4,5).

Для выделения, очистки и идентификации природных порфиринов часто используют их метиловые эфиры, легко получаемые этерификацией метанолом, содержащим хлористый водород или серную кислоту, или диазометаном. Метиловые эфиры представляют собой соединения с высокой, вполне определенной температурой плавления, гораздо лучше растворимые в обычных органических растворителях; эти вещества легче перекристаллизовываются (например, из смеси хлороформ—метанол) и, таким образом, гораздо удобнее для идентификации, чем соответствующие порфирины.

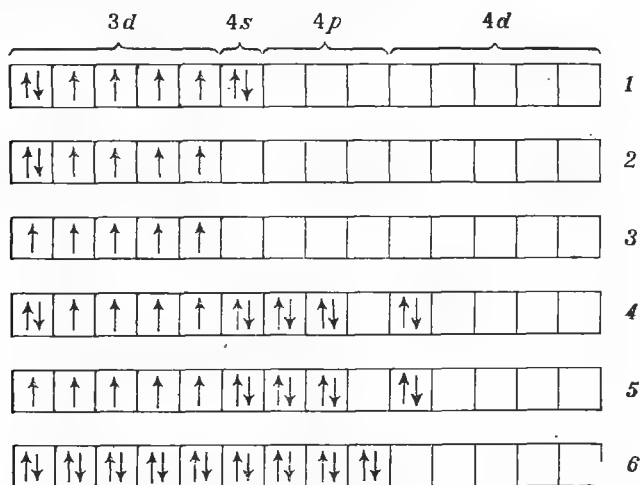
Кислотно-основные свойства порфиринов определяются наличием в молекуле двух атомов азота, способных отдавать или присоединять протоны, и двух атомов азота, способных к присоединению протонов. В соответствии с этим молекула порфина теоретически может существовать в двух анионных и четырех катионных формах и ведет себя как амфолит:



Металлопорфирины. Порфирины могут образовывать комплексные соли не только с железом, как в гемине (Fe^{3+}) и геме (Fe^{2+}), или с магнием, как в филлинах — магнийпорфиринах, но и с цинком, медью, кобальтом и другими металлами. Устойчивость этих комплексов различна. Так, для удаления магния и свинца достаточно обработка комплекса разбавленной уксусной кислотой, для разложения порфириновых комплексов железа (Fe^{2+}), цинка и олова (Sn^{2+}) необходима уже обработка соляной кислотой, а Sn^{4+} и алюминий вообще не удаляются [3].

В природе встречаются только порфириновые комплексы железа (гемоглобин и цитохромы) и магния (хлорофиллы). Выделен также медный комплекс уропорфирина III — турацин. Кобальт входит в состав порфириноподобной системы — цианкобаламина, витамина B_{12} .

Каким образом образуется соединение железа с порфирином? Внешняя оболочка атома железа имеет электронную конфигурацию $3d^64s^2$ (1):



Для образования двухвалентного иона железа Fe^{2+} необходимо удалить два электрона с $4s$ -орбитали (2), а для образования Fe^{3+} — еще один электрон с $3d$ -орбитали (3) [4].

Если из молекулы порфина удалить два протона, стоящие у атомов азота, образуется двухвалентный анион P^{2-} . Каждый атом азота имеет по свободной электронной паре, за счет которых и образуются четыре связи железо—азот. Наиболее выгодная гибридизация dsp^2 .

Атом железа лежит при этом в центре порфинового ядра, и четыре связи направлены к углам квадрата. Наличие четырех и пяти неспаренных электронов на $3d$ -орбиталях настолько выгодно, что для сохранения этой конфигурации связывающие электроны занимают энергетически менее выгодную $4d$ -орбиталь (4, 5).

Гем может образовывать с азотистыми основаниями соединения — гемохромы за счет свободных электронных пар азота этих оснований; так, с пиридином гем дает пиридин-гемокром. К одной молекуле гема присоединяются две молекулы азотистого основания. Координационное число железа в этих соединениях равно 6, наиболее выгодная гибридизация d^2sp^3 ; наличие двух пар электронов на $4d$ -орбиталях энергетически невыгодно и связи образуются за счет электронов $3d$ -, $4s$ - и $4p$ -орбиталей (6).

Четыре связи $\text{Fe}-\text{N}$ направлены к углам квадрата, а две — перпендикулярно плоскости молекулы.

Спектры порфиринов

Электронные спектры. Порфирины имеют очень характерные электронные спектры [4]. Это обстоятельство широко использовалось при установлении структур природных порфиринов, для их характеристи-

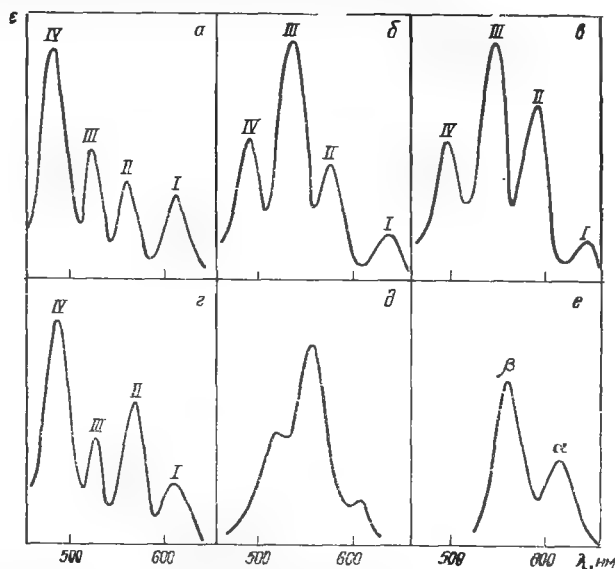


Рис. 6. Типы электронных спектров порфиринов:

а — этио-тип; *б* — родо-тип; *в* — оксородо-тип; *г* — филло-тип; *д* — монокатнон (моноанион); *е* — нонные формы (дикатнон, дианион) или комплексы с металлами.

ки и идентификации. В спектрах порфиринов имеются две полосы поглощения в ультрафиолетовой области, очень интенсивная полоса (полоса Соре) около 400 нм и четыре полосы поглощения в видимой области (рис. 6, *а*). Полоса Соре имеется во всех циклических тетрапиррольных соединениях с замкнутой сопряженной системой; ее интенсивность в 10—20 раз превосходит интенсивность полос в видимой области, и измерение поглощения в области полосы Соре используется

для количественного определения микроколичеств порфиринов в биологических объектах. Четыре полосы поглощения в видимой области обозначаются римскими цифрами (от самой длинноволновой к коротковолновой). Соотношение интенсивностей полос в видимой области спектра дает определенную информацию о строении порфирина, так как тип спектра зависит от количества и типа заместителей в порфиновом ядре и их положения. Различают четыре основных типа спектров порфиринов, которые получили название по названию того порфирина, для которого впервые наблюдались: *этио*-тип (этиопорфирин), *родо*-тип (родопорфирин), *оксородо*-тип (оксородопорфирин) и *филло*-тип (филлопорфирин). Эти типы характеризуются различным соотношением интенсивностей полос в видимой области.

Для *этио*-типа спектра (см. рис. 6, а) характерно соотношение интенсивностей: $IV > III > II > I$.

Такой спектр наблюдается у всех порфиринов, имеющих 6 и более алкильных (или карбоксиалкильных) заместителей в β -положениях пиррольных ядер (остальные положения не замещены).

родо-Тип спектра ($III > IV > II > I$) (рис. 6, б) характерен для соединений, имеющих один электроотрицательный заместитель (формильная, ацетильная, карбоксильная, карбалкоксильная и другие группы).

оксородо-Тип спектра ($III > II > IV > I$) (рис. 6, в) наблюдается у тех соединений, у которых две сильные электроотрицательные группы находятся в противоположных (по диагонали) пиррольных кольцах.

филло-Тип спектра ($IV > II > III > I$) (рис. 6, г) дают порфирины, имеющие один или два алкильных заместителя в *мезо*-положениях, а также соединения, в которых четыре или более положений не замещены (например, порфин).

Эта классификация носит чисто эмпирический характер, однако она успешно использовалась при изучении многих порфиринов.

В электронных спектрах порфиринов полоса *Soret* и полосы I и III относятся к электронным переходам, а полосы II и IV — к электронно-колебательным переходам. При переходе от нейтральной формы порфирина к дикатиону, дианиону или комплексу с металлом симметрия молекулы меняется от D_{2h} к D_{4h} , и спектры этих соединений имеют только две полосы поглощения в видимой области — α - (длинноволновая полоса) и β - (рис. 6, е). Моноанион и монокатион имеют промежуточный спектр с тремя полосами поглощения (рис. 6, д). Электронные спектры некоторых порфиринов приведены в табл. 7.

ИК-Спектры. Эти спектры дают информацию о тонкой структуре порфинового ядра. Порфин, в макроцикле которого протоны групп NH связаны с атомами азота соседних пиррольных ядер, должен обладать симметрией C_{2v} , в случае их расположения у атомов азота противоположных пиррольных колец — симметрией D_{2h} . Наличие в ИК-спектре порфина только одной полосы $\nu(NH)$ при 3305 см^{-1} свидетельствует о том, что порфиновый макроцикл имеет симметрию D_{2h} . Характеристические частоты порфинового кольца находятся при 1110 , 770 , 690 и 620 см^{-1} , γ -СН-полосы* пиррольных колец — при 876 — 853 см^{-1} , полосы γ -СН-протонов в *мезо*-положениях — при 852 — 834 см^{-1} .

* Деформационные колебания вне плоскости.

Таблица 7. Электронные спектры некоторых порфиринов

Соединение	$\lambda_{\text{макс}}$, нм ($\varepsilon \cdot 10^{-3}$)				
	полоса Core	полоса IV	полоса III	полоса II	полоса I
Диметилловый эфир протопорфирина IX*	407 (171)	505 (14,5)	541 (11,6)	575 (7,44)	630 (85,38)
Диметилловый эфир гематопорфирина IX**	402 (175,5)	499,5 (14,7)	532 (9,04)	569,2 (6,57)	623 (4,35)
Диметилловый эфир мезопорфирина IX*	400 (166)	499 (13,56)	533 (9,62)	567 (6,48)	621 (4,87)
Тетраметилловый эфир копропорфирина III*	400 (180)	498 (14,34)	532 (9,92)	566 (7,13)	621 (5,0)
Диметилловый эфир дейтеропорфирина IX*	399,5 (175)	497 (13,6)	530 (10,1)	566 (8,21)	621 (4,95)
Диметилловый эфир 2-этил-4-ацетил-дейтеропорфирина IX*	405 (167)	511 (8,6)	551 (11,7)	578 (8,86)	635 (0,97)
Диметилловый эфир 2,4-диацетилдейтеропорфирина IX***	422 (144)	515 (13,9)	549 (7,35)	585 (6,22)	638 (3,25)
2-Формилдейтеропорфирин III*	414 (177)	515 (10,2)	555 (16,4)	584 (9,5)	642 (2,6)

* В хлороформе.

** В пиридине.

*** В диоксане.

На рис. 7 приведен ИК-спектр диметилового эфира протопорфирина IX.

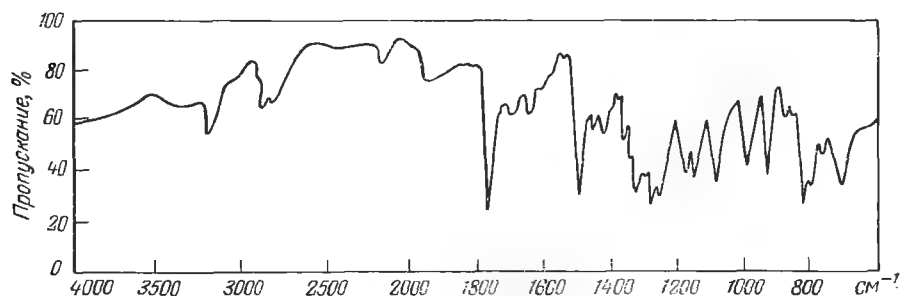


Рис. 7. ИК-Спектр диметилового эфира протопорфирина IX в КВг.

ЯМР-Спектры. Характерные структурные особенности порфиринов делают их очень удобными объектами для изучения и идентификации с помощью ЯМР-спектроскопии. Расстояния между протонами ядра и заместителями в ядре достаточно велики, что обуславливает слабое магнитное взаимодействие между ними (за исключением взаимодействия протонов в таких заместителях, как этильная, винильная и другие группы). Это приводит к тому, что ПМР-спектр порфирина состоит в основном из синглетов и легко поддается расшифровке.

ПМР-Спектры порфиринов вначале были получены для растворов в дейтерохлороформе, однако более четкие результаты наблюдались для растворов в трифторуксусной и дейтеротрифторуксусной кислотах (рис. 8). Значения химических сдвигов сигналов протонов в ПМР-спектрах некоторых природных порфиринов приведены в табл. 8.

Т а б л и ц а 8. Химические сдвиги протонов некоторых порфиринов
(в трифторуксусной кислоте) [5] (δ в млн^{-1})

Соединение	Прото- ны группы NH	мезо-Н	Протоны β -заместителей			
			CH_3	CH_2CH_3	$\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOCH}_3$	другие про- тоны
Порфин	—4,40	11,22	—	—	—	9,92 (β -H)
Этиопорфин III	—4,86	11,00	3,78	4,29; 1,82	—	—
Тетраметиловый эфир копропорфина II	—4,29	11,22 (α , γ) 11,06 (β , δ)	3,83	—	4,73; 3,30; 3,78	—
Тетраметиловый эфир копропорфина III	—4,26	11,12	3,83	—	4,67; 3,32; 3,78	—
	—*	11,21 (γ) 11,11 (α , β) 11,02 (δ)	3,84	—	4,68; 3,35; 3,79	—
	—*	11,27 (β , δ) 11,17 (α , γ)	—	—	4,71; 3,30; 3,79	$\text{CH}_2\text{COOCH}_3$ 5,46; 3,88
Диметиловый эфир мезо-порфина IX	—4,48	11,18 (γ)	3,81	4,31; 1,84	4,72; 3,31, 3,76	—
	—4,62	11,03 (α , β , δ)	—	—	4,68; 3,28; 3,75	$\text{CH}=\text{CH}_2$ 8,29; 6,57; 6,39
Диметиловый эфир прото-порфина IX	—4,37	11,21 (γ) 11,03 (α , β , δ)	3,79	—	—	—

* В дейтеротрифторуксусной кислоте.

Характерной особенностью ПМР-спектров порфиринов являются необычные химические сдвиги, обусловленные кольцевым током, возникающим вследствие движения π -электронов по замкнутой траектории

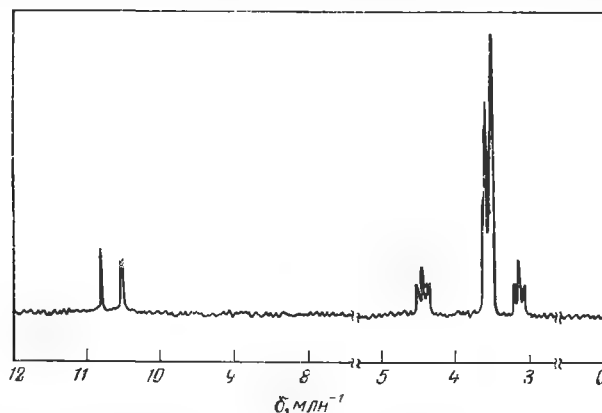


Рис. 8. ПМР-Спектр тетраметилового эфира копропорфина II в дейтерохлороформе с 1% трифторуксусной кислоты.

порфинового кольца. Так, химические сдвиги протонов в *мезо*-положениях порфинового ядра смещены приблизительно на 5 млн⁻¹ в сторону низкого поля по сравнению с нормальными химическими сдвигами oleфиновых протонов, а химические сдвиги NH-протонов — на 12 млн⁻¹ в сторону высокого поля.

На основании данных ПМР-спектров оказывается возможным установить тип изомера порфирина, содержащего два различных заместителя. Два соседних β-заместителя оказывают наибольшее влияние на сдвиг протона в *мезо*-положении, причем вклады обоих β-заместителей аддитивны. Для алкильных и винильных групп этот вклад составляет 0,11 млн⁻¹, для остатков пропионовой кислоты 0,02 млн⁻¹, уксусной кислоты 0,03 млн⁻¹. Поэтому для изомеров типа I, у которых протоны в *мезо*-положениях испытывают влияние одних и тех же заместителей, в ПМР-спектрах будет наблюдаться сигнал *мезо*-протонов в виде синглета. Протоны в *мезо*-положениях изомеров типа II (см. стр. 101) будут давать дублет (см. рис. 8), а протоны изомеров типов III и IV — триплет с соотношением интенсивностей 1 : 2 : 1.

Ценную информацию о структуре порфиринов дают ЯМР-спектры на ядрах ¹³C. Химические сдвиги сигналов ¹³C в спектрах некоторых порфиринов с природным содержанием этого изотопа приведены в табл. 9. Можно однозначно отнести сигналы всех углеродных атомов боковых цепей и атомов порфинового ядра, связанных с протонами, однако сигналы *мезо*-углеродных атомов не удается дифференцировать [6].

Для однозначного отнесения сигналов *мезо*-углеродных атомов в протопорфирине IX были использованы [7] диметилловые эфиры β-¹³C-, γ-¹³C- и δ-¹³C-протопорфиринов IX. В ЯМР-спектрах этих соединений, разбавленных немеченым диметилловым эфиром протопорфирина IX до концентрации ¹³C 5 атом. %, наблюдались 4 сигнала *мезо*-углеродных атомов: один — очень интенсивный и три — с небольшой интенсивностью. Было установлено, что α-*мезо*-углеродный атом дает сигнал при δ 97,7 млн⁻¹, β- при 97,1, δ- при 96,7 и γ- при 95,8 млн⁻¹. Аналогичным

Таблица 9. Химические сдвиги на ядрах ¹³C некоторых порфиринов с природным содержанием изотопа ¹³C по отношению к CS₂ (в млн⁻¹) [6]*

Соединение	Атомы углерода ядра		Атомы углерода заместителей			
	C ₂ и C ₄ **	<i>мезо</i> -C	CH ₃		A B CH ₂ -CH ₂ -COOR	
			1,3	5,8	6,7-A	6,7-B
Диметилловый эфир дейтеропорфирина IX	63,9	92,3; 93,1; 95,5; 96,5	178,9	180,9	170,6	155,1
Диметилловый эфир 2,4-диацетилдейтеропорфина IX	-5,3	90,6; 92,8; 95,7; 97,2	178,9	181,0	171,0	155,9
Диметилловый эфир <i>мезо</i> -порфирина IX	172,6	96,2	174,7	180,9	170,4	155,0
Диэтиловый эфир протопорфирина IX	62,1	95,6 (шир.)	180,0	180,7	170,5	155,1

* В CHCl₃ при 15,08 мГц и 42 °C.

** В дейтеропорфирине химические сдвиги C₂ и C₄ порфинового ядра, в других порфиринах — химические сдвиги атомов углерода, связанных с C₂ и C₄.

Для экстракции порфиринов из биологических жидкостей, животных и растительных тканей наиболее часто применяют ацетон, содержащий небольшое количество (1—5 объемн. %) концентрированной соляной кислоты, или смесь этилацетата с уксусной кислотой (3:1 по объему) [11].

Для разделения смесей порфиринов широко использовались различия в их коэффициентах распределения между эфиром и соляной кислотой. Для количественной характеристики этой способности одним из пионеров в области исследования порфиринов Р. Вильштеттером было введено такое понятие, как «солянокислое число»: концентрация соляной кислоты (в г/100 мл), при которой из равного объема эфирного раствора экстрагируется две трети всего количества порфирина. Солянокислые числа некоторых порфиринов приведены ниже:

	Свободный порфирин	Метиловый эфир
Уропорфирин*	—	1,5
Копропорфирин	0,08	1,5
Гематопорфирин	0,1	—
Дейтеропорфирин	0,3	2,0
Мезопорфирин	0,5	2,5
Протопорфирин	2,5	5,5
Этиопорфирин	3,0	—
Хлорокруоропорфирин	4,6	—

* Уропорфирины нерастворимы в эфире.

Метод нашел дальнейшее развитие в разделении смесей порфиринов противоточным распределением между органическими растворителями и разбавленными растворами соляной кислоты.

Однако наилучшими и наиболее универсальными методами разделения и очистки порфиринов являются хроматографические методы. Хроматографию порфиринкарбоновых кислот можно проводить на тальке или целите, элюируя их водной соляной кислотой, причем в последнем случае достигается даже частичное разделение уропорфиринов I и III.

Лучших результатов при разделении смесей порфиринов удается достичь, используя их метиловые эфиры, которые хорошо растворимы в ряде органических растворителей, четко разделяются при хроматографии и легко перекристаллизовываются. Кислоты этерифицируют при растворении в безводном метаноле, насыщенном хлористым водородом, или при выдерживании в метаноле, содержащем 5 объемн. % концентрированной серной кислоты.

Для разделения эфиров порфиринкарбоновых кислот с успехом используют колоночную хроматографию на окиси алюминия, карбонате кальция, окиси магния, карбонате магния, а в качестве растворителей — петroleйный эфир, хлороформ, метанол. Легкость элюирования эфиров на этих адсорбентах зависит от числа карбоксильных групп: на окиси алюминия или карбонате кальция она увеличивается от уропорфирина (8 COOH) к копропорфиру (4 COOH) и к протопорфиру (2 COOH); при хроматографии на колонках с окисью маг-

ния или карбонатом магния порядок элюирования меняется на обратный.

Сложной проблемой при разделении смесей порфиринов является разделение изомеров. Частичное разделение уропорфиринов I и III достигается при хроматографии на целите в водной соляной кислоте; на этом же носителе удастся добиться разделения их метиловых эфиров.

Наибольшее распространение при анализе смесей порфиринов получил метод хроматографии на бумаге [12] в смесях лутидина с водой в атмосфере аммиака. В этих условиях значения R_f порфиринов находятся в обратной зависимости от числа карбоксильных групп в боковых цепях (наименьшее значение R_f имеют уропорфирины, наибольшее — порфирины, содержащие одну COOH -группу, эфиры движутся с фронтом). Для хроматографии использовалась смесь 2,4- и 2,5-лутидинов и 2,4-лутидин, однако наиболее приемлемым оказался 2,6-лутидин. При использовании этого растворителя удалось разделить копропорфирины I, II и III.

Для разделения порфиринкарбоновых кислот был использован также 0,1 М водный раствор хлористого лития в атмосфере аммиака. При этом пятна порфиринов на хроматограмме расположены в обратном порядке по отношению к тому, который наблюдается при использовании систем с лутидином; наибольшее значение R_f (около 0,9) имеют уропорфирины, наименьшее (0,05—0,09) — гематопорфирин.

Метиловые эфиры порфиринкарбоновых кислот разделяют хроматографией на бумаге при двукратном пропускании растворителя; сначала смесь хлороформа с керосином (2,6 : 4,0), а затем — смесь *n*-пропанола с керосином или одним из высших углеводородов (1 : 5). При разделении эфиров этим методом наблюдается приблизительно обратная зависимость между значением R_f и числом карбоксильных групп, как и в случае разделения порфиринкарбоновых кислот в системах, содержащих лутидин. В этой системе хорошо разделяются также метиловые эфиры копропорфиринов I (R_f 0,5) и III (R_f 0,7). Модификацией метода является однократная хроматография метиловых эфиров порфиринов в системе изеооктан — четыреххлористый углерод (3 : 7).

Метиловые эфиры уропорфиринов I и III удалось разделить хроматографией смеси сначала в системе керосин — хлороформ, затем в системе керосин — диоксан.

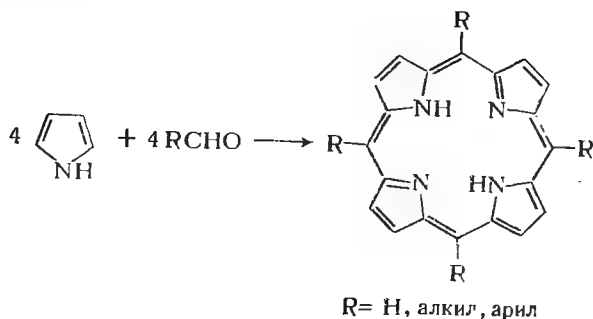
Система 2,6-лутидин — вода (10 : 3) была использована для разделения копропорфиринов I (R_f 0,19) и III (R_f 0,25) с помощью тонкослойной хроматографии на силикагеле.

СИНТЕЗ ПОРФИРИНОВ

Основным методом выяснения и окончательного доказательства строения природных порфиринов является их синтез. Известные в настоящее время методы синтеза порфиринов можно разделить на три большие группы по виду соединений, используемых для конечной циклизации в макроцикл: 1) синтез из монопирролов; 2) синтез из дипиррольных соединений; 3) синтез из тетрапиррольных соединений.

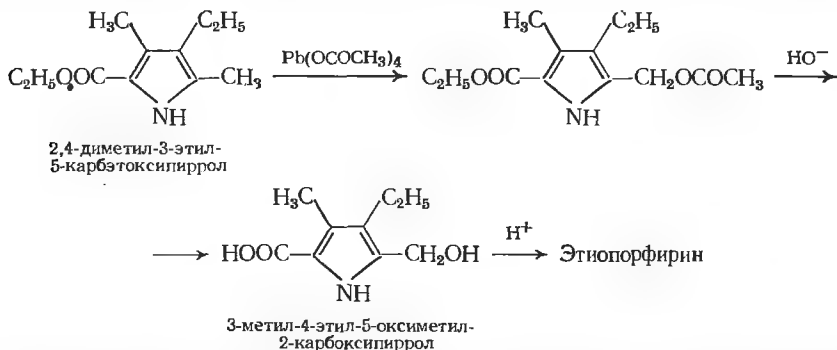
Синтез из монопирролов. мезо-Тетразамещенные порфины и сам порфин ($R=H$) получают конденсацией пиррола с альдегидами по ме-

тому, предложенному Роземундом [13]:



Метод широко использовался для получения мезо-тетрафенилзамещенных порфиринов и их комплексов с металлами (выходы ~20%) [14]. Реакция Роземунда не может быть использована для получения природных порфиринов или их производных.

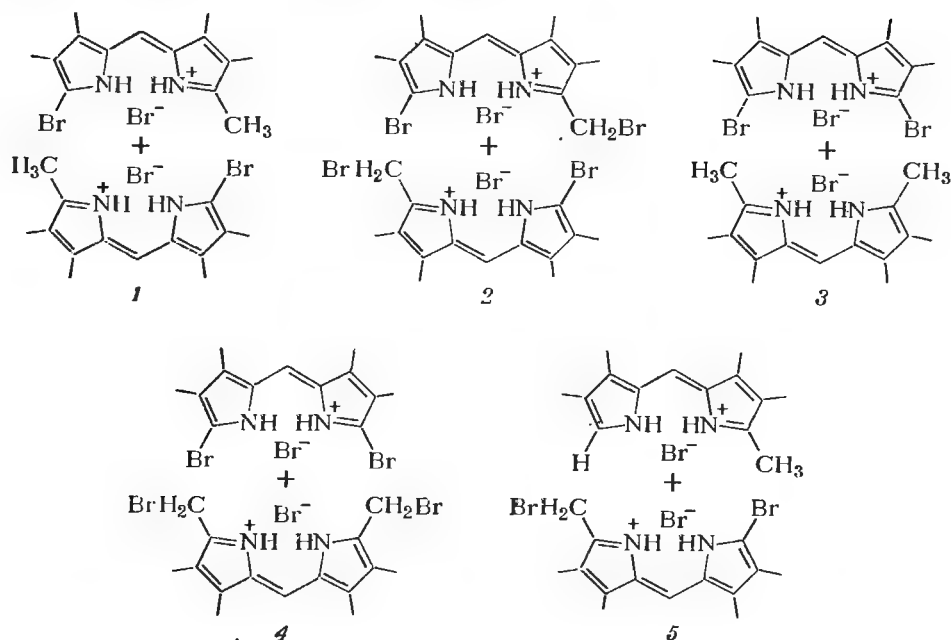
Другой метод синтеза порфиринов из монопирролов предложен Зиделем и Винклером [15], которые получили этиопорфирин (по мнению авторов, смесь I и II изомеров) нагреванием с разбавленной соляной кислотой 3-метил-4-этил-5-оксиметил-2-карбоксипиррола; последний был получен окислением 2,4-диметил-3-этил-5-карбэтоксипиррола тетраацетатом свинца и последующим гидролизом образующегося соединения:



Этим методом были синтезированы уропорфирин, как считали авторы, природного типа III [16], и копропорфирин [17], который также был отнесен к типу III. Однако более детальные исследования [18] показали, что при этом образуется не индивидуальный изомер III, а смесь всех четырех изомеров. Метод, таким образом, непригоден для получения индивидуальных природных порфиринов.

Синтез из дипиррольных соединений. Основные работы по установлению строения и синтезу природных порфиринов, их аналогов и гомологов базировались на методе синтеза порфиринов из bromированных дипиррилметенов. Были осуществлены реакции конденсации следующих дипиррилметенов: 1) α-бром-α'-метилдипиррилметена, 2) α-бром-α'-бромметилдипиррилметена, 3) α,α'-дибромдипиррилметена с α,α'-диметилдипиррилметеном, 4) α,α'-дибромдипиррилметена с α,α'-ди-(бромметил)-дипиррилметеном, 5) α'-метилдипиррилметена с

α -бром- α' -бромметилдипиррилметеном:



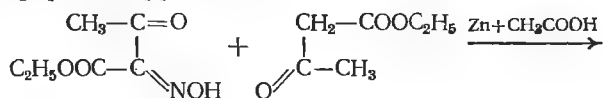
Конденсация дипиррилметенов осуществляется обычно сплавлением в винной, янтарной или метилянтарной кислотах, реже — нагреванием при кипении в *трет*-бутиламине или нафталине в присутствии хлористой меди или кипячением в терфениле в присутствии порошкообразного серебра.

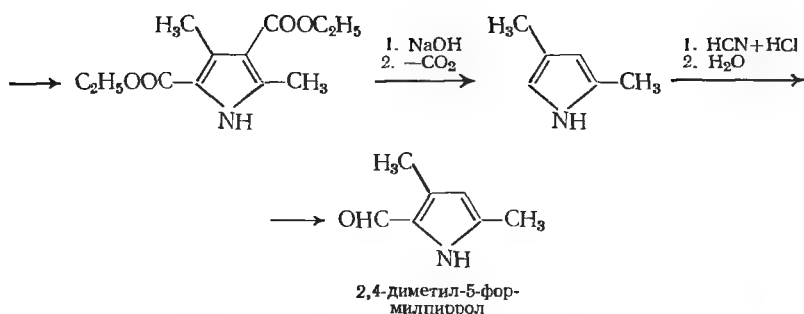
При помощи этого метода были выяснены структуры большинства природных порфиринов [1], синтезированы этиопорфирин III [19], копропорфирины II и IV [20], уропорфирин III [21], цитодейтеропорфирин [22] и производные хлоробииумхлорофилла [23].

Типичным примером синтеза из дипиррилметенов является синтез протогемина IX, осуществленный Г. Фишером [1]. Данный метод непригоден для получения порфиринов, содержащих легко отщепляющиеся группы (винильные, ацетильные, юксиэтильные и др.), поэтому первым этапом в синтезе протогемина IX было получение дейтеропорфирина IX, не содержащего таких групп.

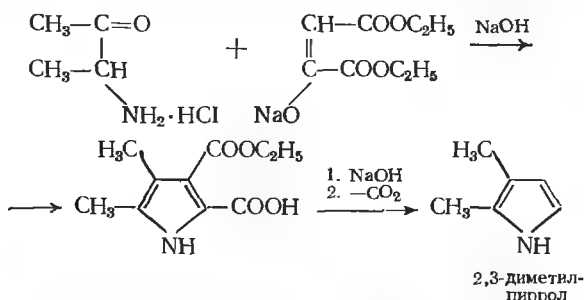
Синтез дипиррилметенов, необходимых для получения дейтеропорфирина, осуществили следующим образом.

1. Конденсацией изонитрозоацетоуксусного и ацетоуксусного эфиров под действием цинка в уксусной кислоте (конденсация по Кнорру) получен диэтиловый эфир 2,4-диметилпиррол-3,5-дикарбоновой кислоты. Омыление и последующее декарбоксилирование этого эфира приводят к 2,4-диметилпирролу, формилирование которого синильной кислотой в присутствии хлористого водорода по Фишеру—Цервеку дает 2,4-диметил-5-формилпиррол:

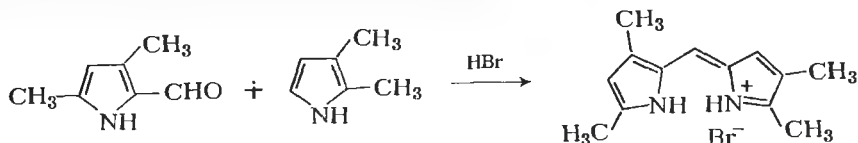




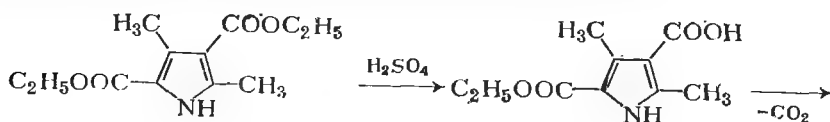
Реакция гидрохлорида 2-аминобутанона-3 с диэтиловым эфиром натрийоксалилацетата в щелочной среде (модификация реакции Кнорра) дает моноэтиловый эфир 2,3-диметилпиррол-4,5-дикарбоновой кислоты, омыление и декарбоксилирование которого приводит к 2,3-диметилпирролу:

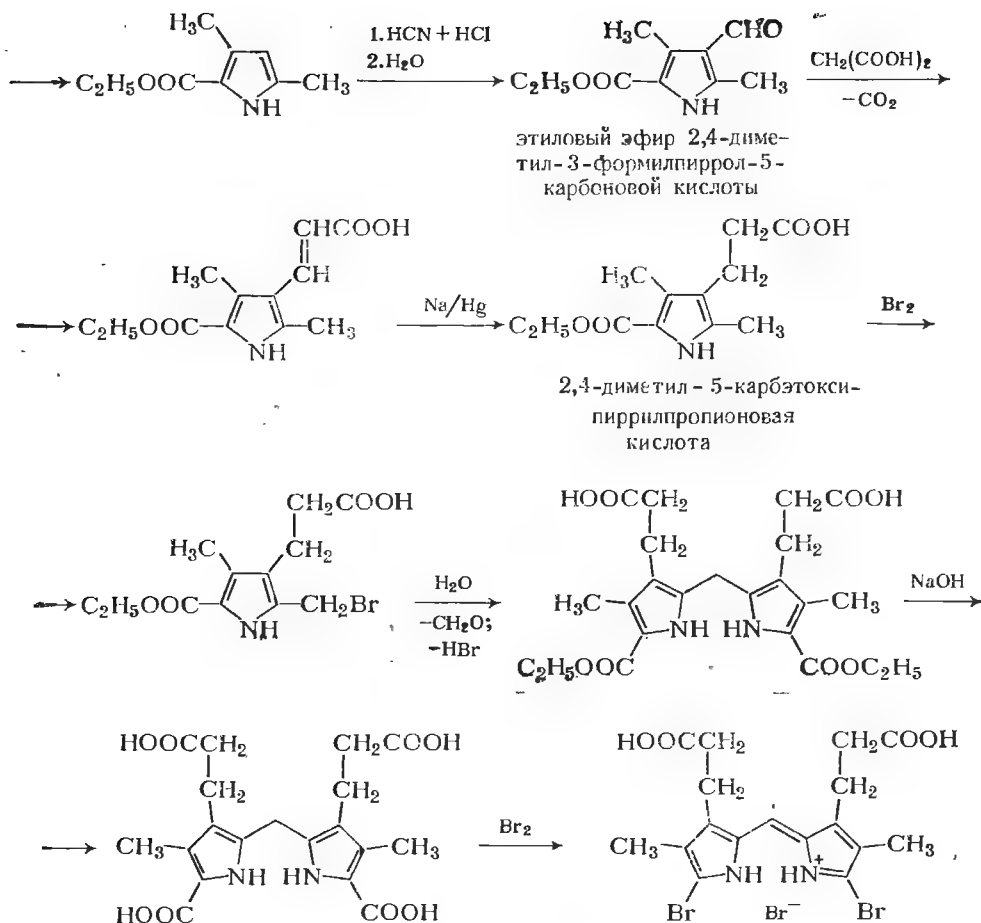


Конденсация 2,3-диметилпиррола с 2,4-диметил-5-формилпирролом под действием бромистоводородной кислоты дает гидробромид (3,5,4',5'-тетраметилдипиррил-2,2')-метена:



2. Второй дипиррилметен, необходимый для синтеза дейтеропорфирина, получался более длинным путем. В качестве исходного вещества был использован диэтиловый эфир 2,4-диметилпиррол-3,5-дикарбоновой кислоты, омыление β -карбэтоксигруппы которого концентрированной серной кислотой с последующим декарбоксилированием и формилированием дают этиловый эфир 2,4-диметил-3-формилпиррол-5-карбоновой кислоты. Конденсация этого эфира с малоновой кислотой и последующее восстановление амальгамой натрия приводят к β -(2,4-диметил-5-карбэтоксипиррил-3)-пропионовой кислоте, бромирование которой, последующее кипячение с водой, омыление щелочью и вновь бромирование дают соответствующий дипиррилметен:



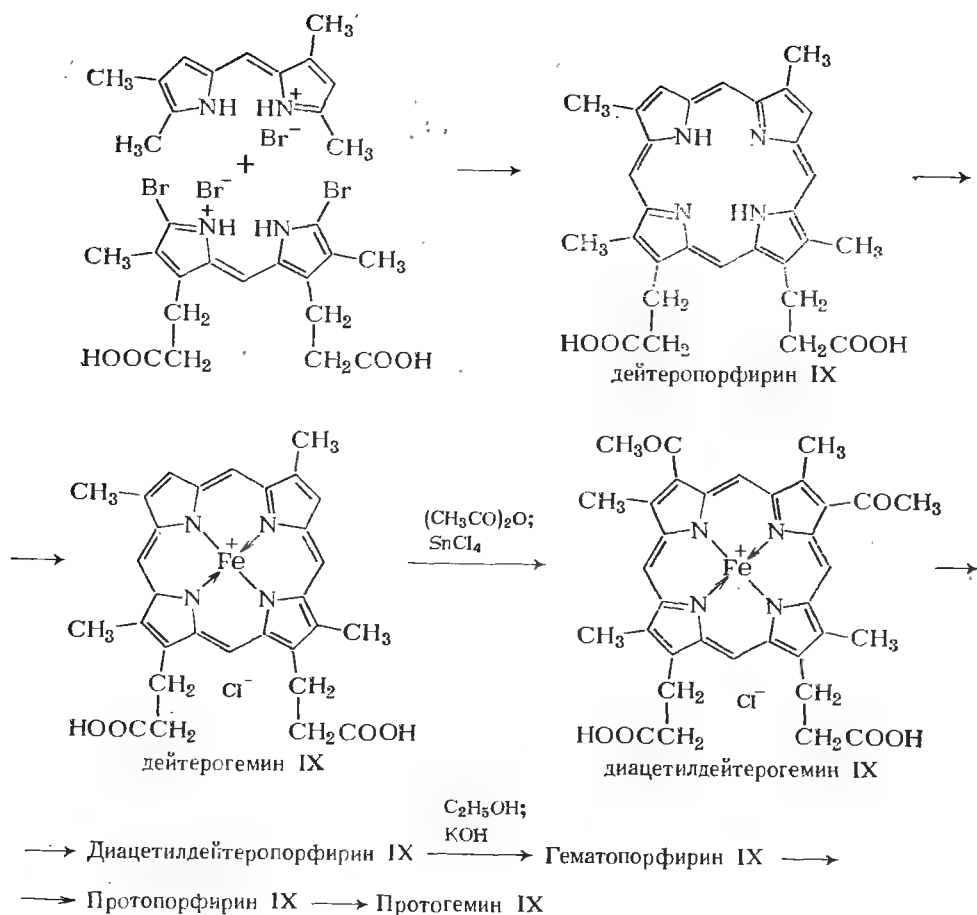


Сплавлением полученных дипиррилметенов в янтарной кислоте получен дейтеропорфирин IX.

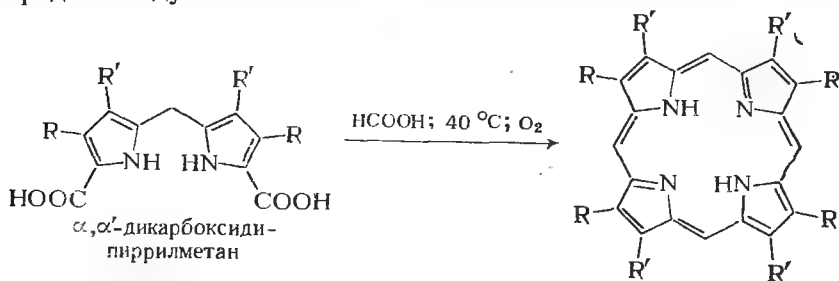
Введение в порфиновое ядро винильных групп достигалось ацелированием, восстановлением ацетильных групп в оксиэтильные и последующей дегидратацией.

Ацелирование под действием хлорного олова по Фриделю — Крафтсу дейтерогемина IX, полученного из дейтеропорфирина действием хлорного железа (реакция Фриделя — Крафтса проходит гораздо лучше с металлокомплексами, чем со свободными порфиринами), дало диацетилдейтерогемин IX. Полученный из него в результате удаления железа диацетилдейтеропорфирин IX восстанавливался спиртом и едким кали в гематопорфирин IX; спирт при этой реакции окисляется до уксусной кислоты, а выделяющийся водород превращает ацетильные группы в оксиэтильные. При нагревании в вакууме гематопорфирин IX терял две молекулы воды и давал протопорфирин IX, из которого при обработке хлористым железом получался протогемин IX (см. стр. 117).

Синтез порфиринов из дипиррилметенов проводится в жестких условиях, что в ряде случаев приводит к низким выходам и не позволяет получать порфирины, содержащие лабильные электроотрицательные заместители.



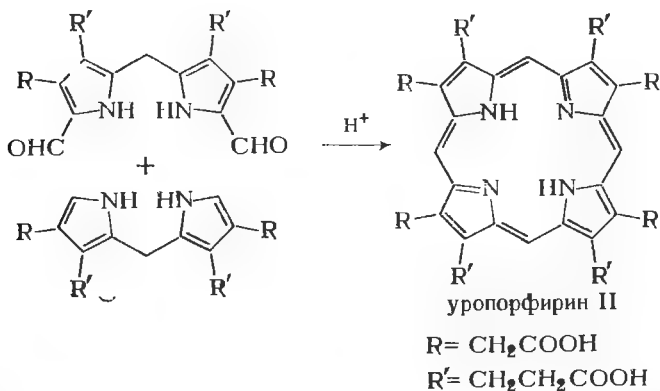
В гораздо более мягких условиях протекает синтез порфиринов из дипиррилметанов, который часто дает лучшие результаты. Однако до недавнего времени дипиррилметаны относительно мало использовались в синтезе порфиринов, отчасти вследствие того, что при этом образуются смеси порфиринов в результате разрыва и рекомбинации метиленовых мостиков. Наиболее надежным с точки зрения получения индивидуального изомера считался так называемый холодный метод, заключающийся в многочасовой обработке α, α' -дикарбоксидипиррилметана муравьиной кислотой при 40°C с одновременным окислением кислородом воздуха:



При использовании симметричных дипиррилметанов метод дает возможность получать порфирины типа II, в других случаях — смеси изомеров.

Однако применение «холодного метода» для синтеза уропорфирина II ($R=CH_2COOH$, $R'=CH_2CH_2COOH$) [24] приводит к смеси изомеров; индивидуальный изомер II был получен в результате обработки α,α' -незамещенного дипиррилметана муравьиной и бромистоводородной кислотами.

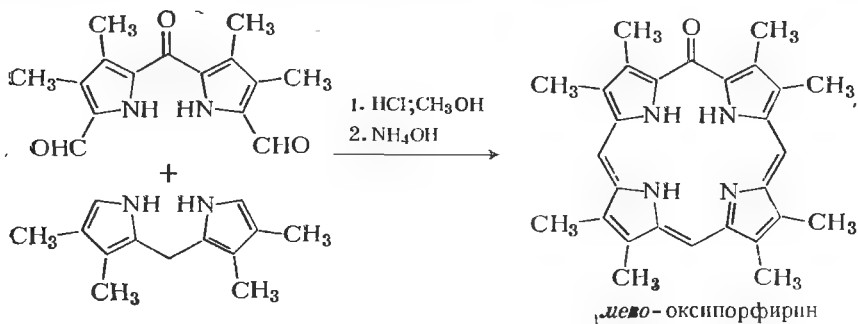
Новую возможность для использования дипиррилметанов дал метод синтеза порфиринов конденсацией α,α' -диформил- и α,α' -незамещенных дипиррилметанов (метод Мак-Дональда) [21, 25]:



Оптимальными условиями конденсации являются проведение реакции в среде уксусной кислоты, содержащей каталитическое количество иодистоводородной кислоты, при комнатной температуре. Этим методом были получены уропорфирины типов II, III и IV с выходами 65, 60 и 55% соответственно.

Дальнейшая модификация этого метода заключается в применении α,α' -дикарбосидипиррилметанов вместо неустойчивых, легко окисляющихся α,α' -незамещенных дипиррилметанов [26—28]. Эта модификация была использована для синтеза этиопорфирина III и мезопорфирина IX [29], протопорфирина III [30], винилпорфиринов [31].

Для синтеза порфиринов применяют также дипиррилкетоны. Конденсация α,α' -диформилдипиррилкетона с α,α' -незамещенным дипиррилметаном дает *мезо*-оксипорфин [32], имеющий структуру кето-таутомера [33]:



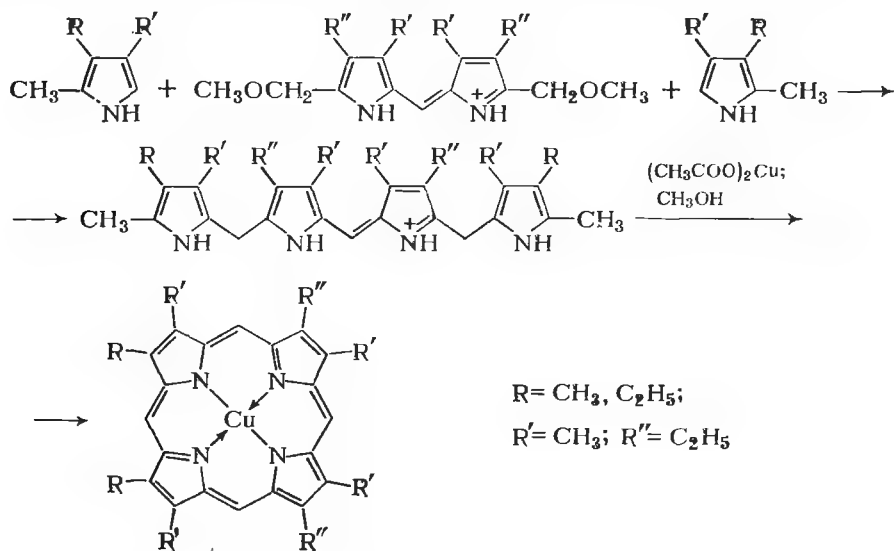
мезо-Оксопирфирины могут быть восстановлены в порфирины, не содержащие *мезо*-оксигруппы.

Синтез из тетрапиррольных соединений. Идеальный метод синтеза порфиринов должен исходить из линейного тетрапиррольного промежуточного соединения с доказанной структурой, причем в процессе циклизации в порфирин не должна происходить изомеризация ни исходного линейного соединения, ни возникающего из него циклического продукта. Не говоря уже о большей доказательности такого метода при установлении строения порфиринов, он позволяет преодолеть ограничения симметрии, неизбежные в случае одностадийного синтеза из дипиррольных соединений, и, следовательно, позволяет получать порфирины, имеющие низкую степень симметрии.

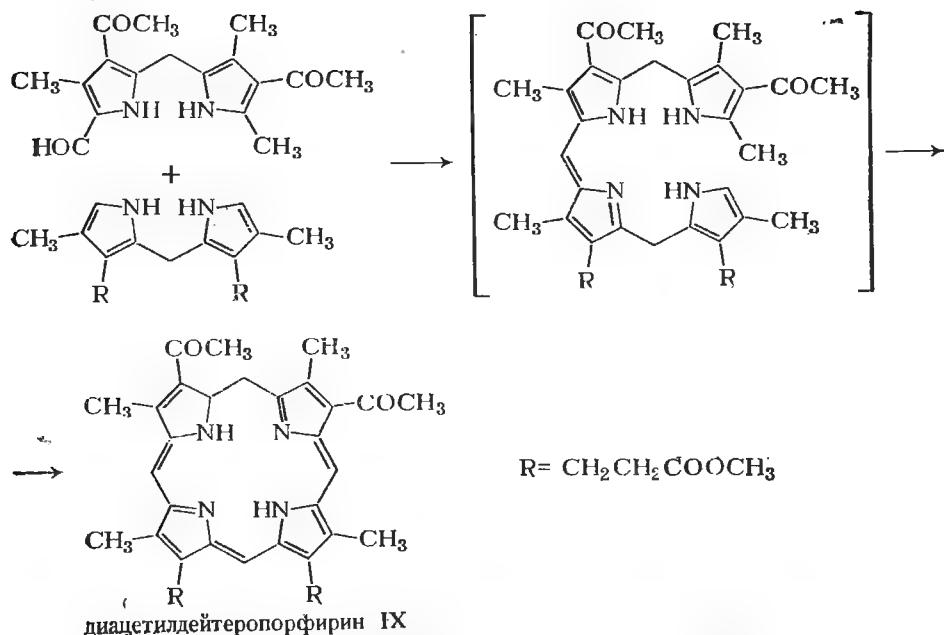
Формально для получения порфиринов могут быть использованы любые производные 1,19-дидезоксибилина, однако обычно применяют только некоторые из производных этого класса: билены-*b*, биладие-ны-*ас*, оксобилены-*a* и -*b*.

Характерной чертой тетрапиррольных соединений, используемых для синтеза порфиринов, является наличие в положениях 1 и 19 заместителей (метил, карбоксил, бром, водород), способных превращаться в моноуглеродное звено либо замещаться моноуглеродным звеном, связывающим два крайних пиррольных кольца.

Метод синтеза порфиринов из биленов-*b* [34] заключается в окислительной циклизации 1,19-диметил-1,19-дидезоксибилина-*b*, полученного конденсацией 5,5'-бис(метоксиметил)дипиррилметана с α -незамещенным триалкилпирролом, под действием ацетата меди в метаноле, реакция дает медный комплекс порфирина с выходом 20—30%:

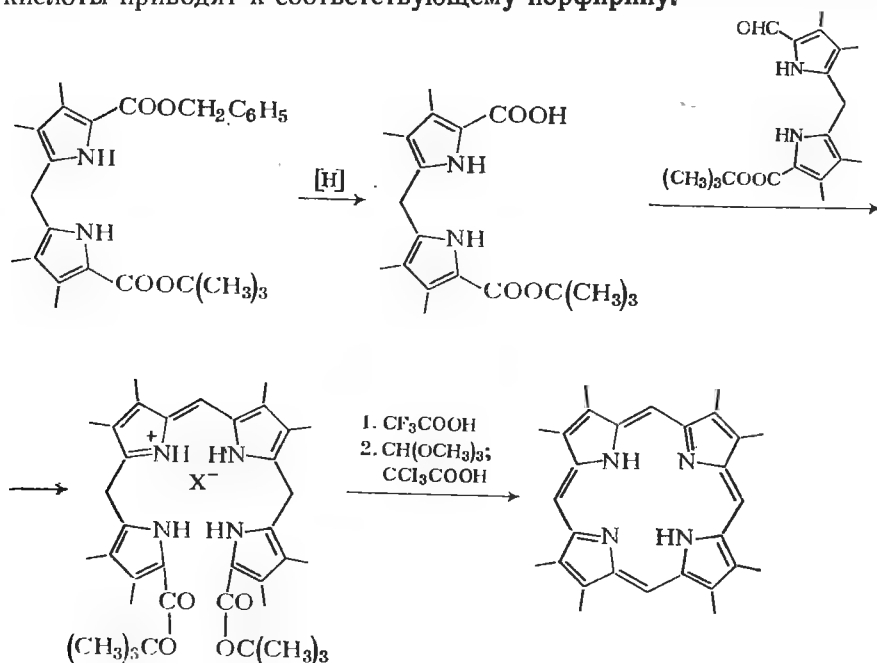


Этот метод был использован для получения диацетилдейтеропорфирина IX конденсацией 4,3'5'-триметил-3,4'-диацетил-5-формилдипиррилметана под действием бромистоводородной кислоты с 4,4'-диметил-3,3'-бис(β -карбметоксиэтил)дипиррилметаном и последующей циклизацией продукта конденсации [35]:



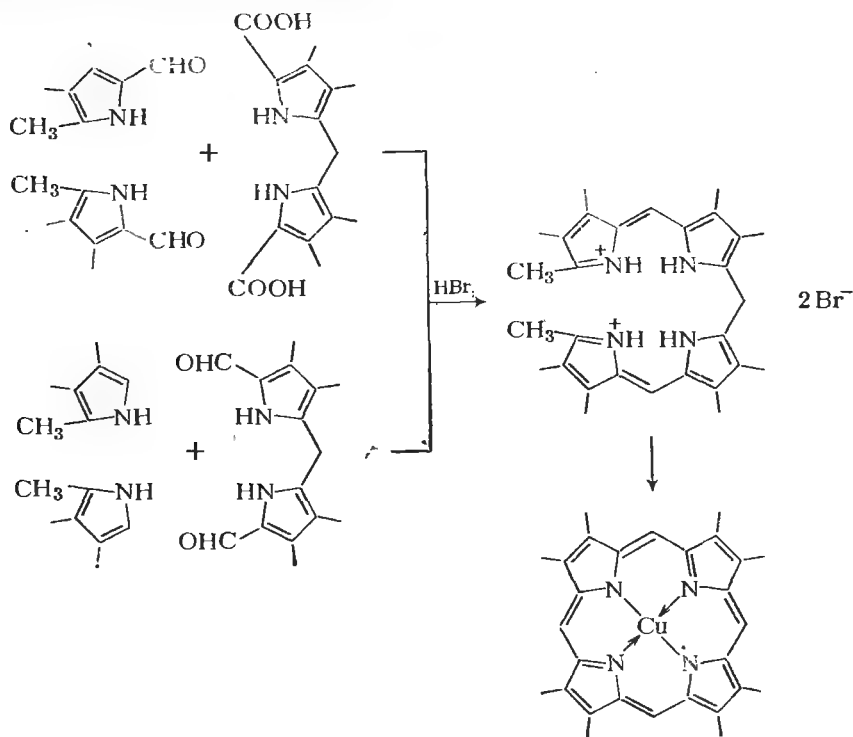
Аналогичным методом осуществлен синтез протопорфирина IX [36].

В другом методе синтеза из биленов-*b* используют циклизацию 1,19-бис(карбо-*трет*-бутокси)биленов-*b* [37], получаемых гидрированием соответствующих дипиррилметанов и реакцией образующихся при этом кислот с формилдипиррилметаном. Обработка получаемого при этом билена трифторуксусной кислотой и последующая циклизация под действием метилового эфира ортомуравьиной кислоты и трихлоруксусной кислоты приводят к соответствующему порфирину:



Этим методом были синтезированы эфиры мезопорфиринов IV, X и XIII с выходами 39—57%.

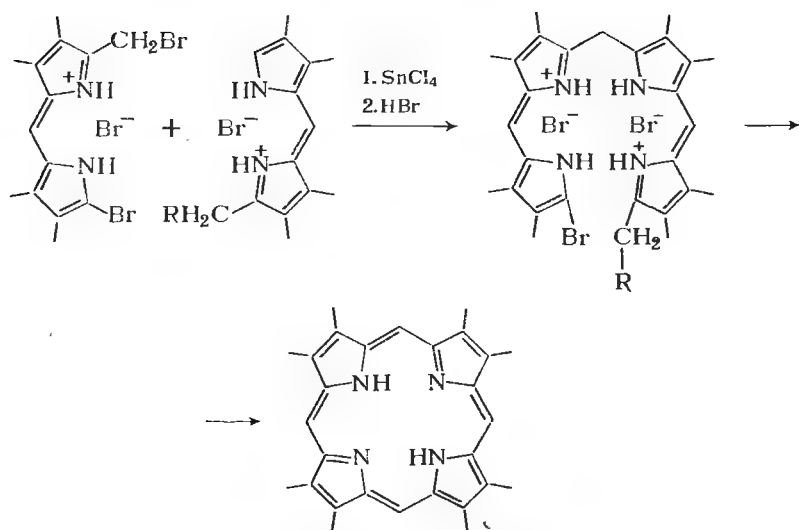
Получение порфиринов из 1,19-диметил-1,19-дидезоксибиладие-нов-ас [34, 38] аналогично синтезу из биленов-*b*. Биладиены-ас получают либо конденсацией 2-формилпирролов с дипиррилметан-5,5'-дикарбоновыми кислотами, либо конденсацией 5,5'-диформилдипиррилметанов с α -незамещенными пирролами. Медный комплекс порфирина получают окислительной циклизацией биладиена-ас в метаноле в присутствии ацетата меди (выход 17%):



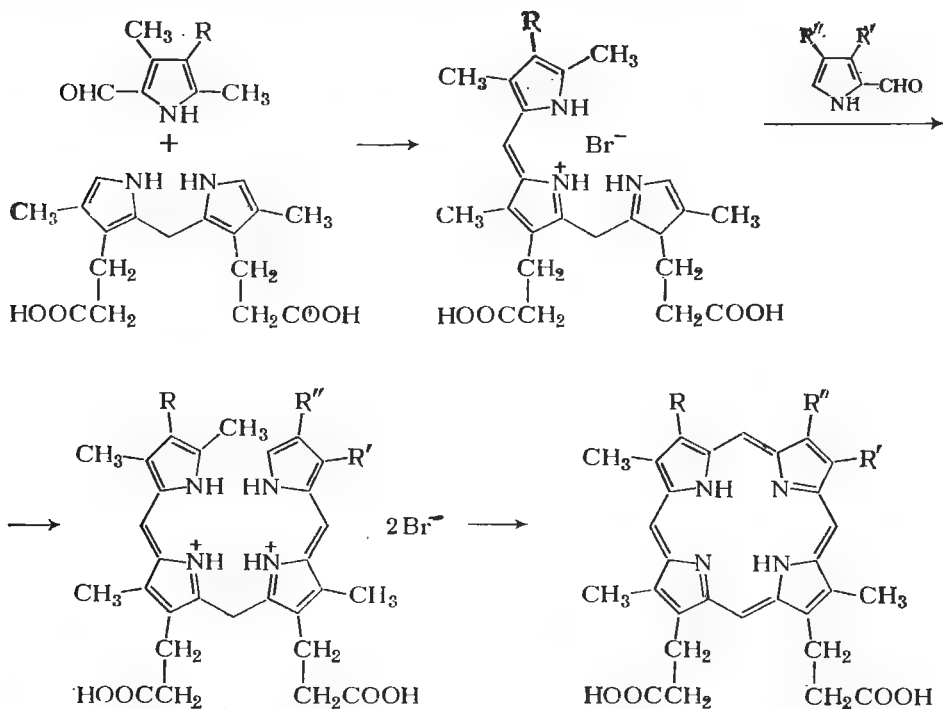
Метод синтеза порфиринов из 1-бром-19-метил-1,19-дидезоксибиладие-нов-ас имеет меньше ограничений в отношении симметрии молекул. Эти биладиены получают конденсацией 5-бром-5'-бромметилдипиррилметана с 5-метил(этил)-дипиррилметеном в хлористом метиле-не в присутствии четыреххлористого олова при комнатной температуре; возникшие первоначально комплексы биладиенов с оловом не выделяют, а превращают действием бромистого водорода в гидробромиды биладие-нов с выходом 70—95%. Гидробромиды циклизуются при на-гревании в *o*-дихлорбензоле [38] или выдерживании в смеси диме-тилсульфоксида и пиридина при комнатной температуре в тече-ние 48 ч.

Этим методом были получены мезопорфирин IX, ряд алкилсодержа-щих порфиринов, протопорфирин IX [39] и производные хлорофил-ла *a* — пирро-, филло- и родопорфирины [38, 40], а также дейтеропор-фирин IX и пемптопорфирин [41].

Еще один вариант синтеза из биладиенов-ас заключается в пред-

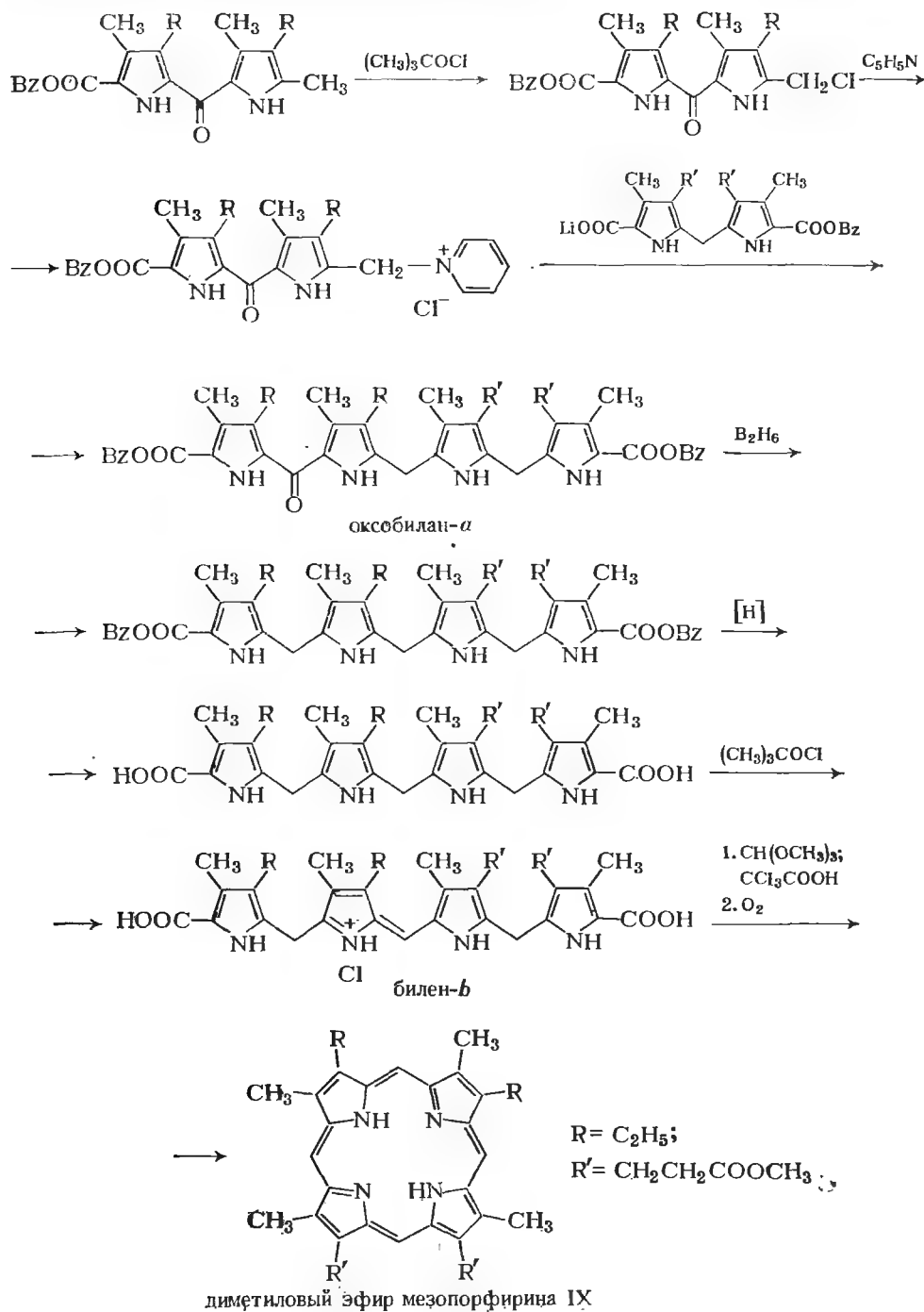


варительном получении трипиррена реакцией 2-формилпиррола с α, α' -незамещенным дипиррилметаном. Взаимодействие полученного трипиррольного соединения с α' -незамещенным α -формилпирролом дает биладииен-ас, нагревание которого в *o*-дихлорбензоле в присутствии иода как окислителя приводит к порфирину [42]:



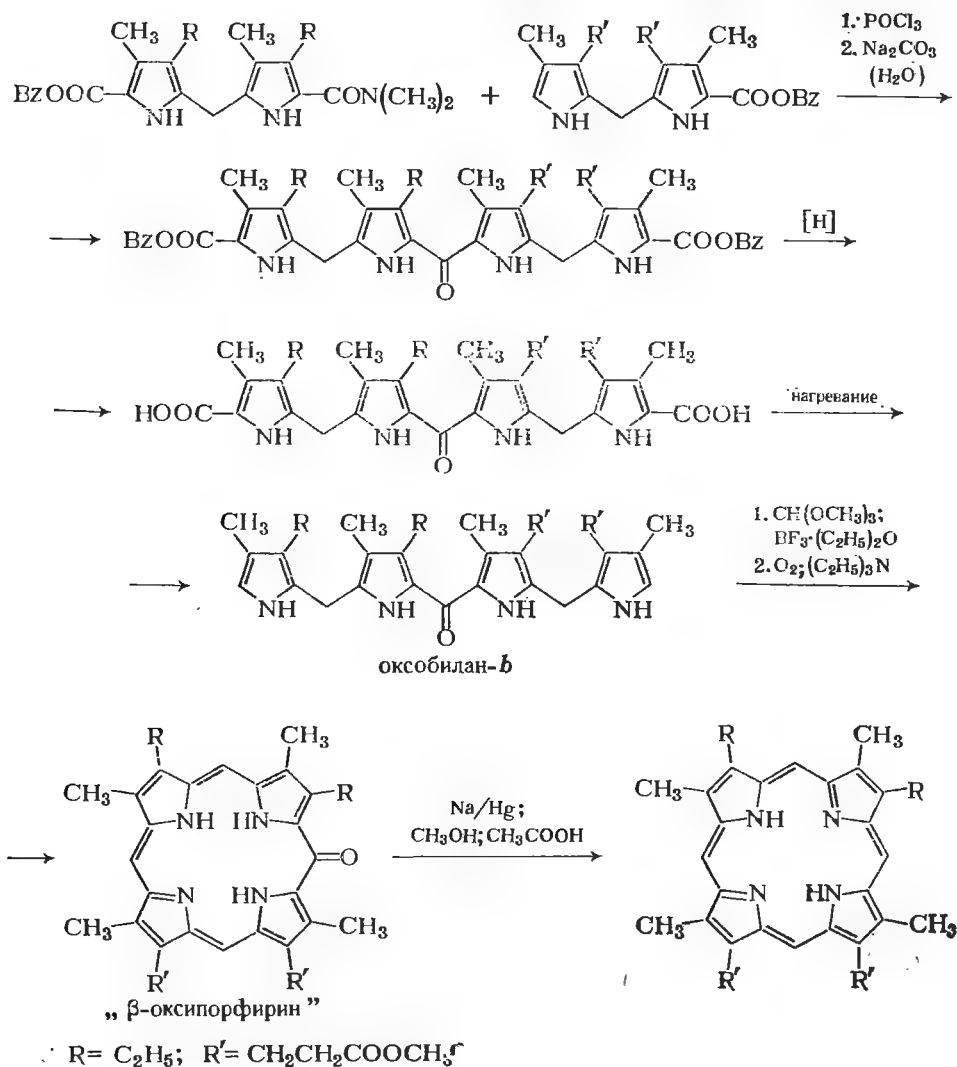
Выход диметилового эфира мезопорфирина IX составил 91%, а дейтеропорфирина — 30%.

В синтезе порфиринов из оксобиланов-а [43] исходными веществами являются дипиррилкетоны; общий метод показан на примере синтеза диметилового эфира мезопорфирина IX:



Хлорирование дитиррилкетона *трет*-бутилтипохлоритом в смеси тетрагидрофуран—эфир и последующая обработка пиридином и литиевой солью дитиррилметанкарбоновой кислоты дают оксобилян-*a*. Восстановление карбонильной группы в этом соединении до метиленовой действием диборана в смеси тетрагидрофурана и этиламетата и снятие бензильной защиты гидрогенолизом приводят к дикарбоновой кислоте, которая уже может циклизироваться в порфирин. Однако такие системы неустойчивы в кислой среде и легко подвергаются изомеризации. Поэтому кислота была предварительно окислена *трет*-бутилтипохлоритом в производное билена-*b*. Последнее циклизовалось под действием метилового эфира ортомуравьиной кислоты и трихлоруксусной кислоты в дигидропорфирин, который после окисления кислородом воздуха дал диметиловый эфир мезопорфирина IX с выходом 25% в расчете на оксобилян-*a*.

Для синтеза порфиринов использованы и производные оксобилянов-*b*:



Реакция амида с α -незамещенным дипиррилметаном под действием хлорокиси фосфора, последующий гидролиз водным раствором карбоната натрия и гидрогенолиз бензильных групп дали дикарбоновую кислоту, декарбоксилирование которой при нагревании привело к 1,19-незамещенному оксобилану-*b*. Циклизация оксобилана-*b* реакцией с метиловым эфиром ортомуравьиной кислоты в хлористом метиле не в присутствии эфирата трехфтористого бора и окисление продукта циклизации кислородом воздуха в присутствии триэтиламина дали « β -оксипорфирин», восстановление которого амальгамой натрия в смеси метанола и уксусной кислоты дало диметиловый эфир мезопорфина IX с выходом 24%.

Оксобиланы-*a* и -*b* были использованы для синтеза протопорфина IX [44], а оксобиланы-*b* — для получения пемпто- и хлорокруоропорфиринов [45].

Особое место в синтезе порфиринов занимают методы введения в порфиновое ядро винильных групп. Способ, использованный Г. Фишером в синтезе протогемина IX, не является наилучшим из-за осложнений, возникающих при синтезе ацетилпорфиринов, и относительно низкого выхода конечных продуктов, поэтому в последнее время был разработан ряд новых методов. Общим для этих методов является получение порфирина, содержащего группы, которые легко могут быть превращены в винильные. Так, в синтезе протопорфина IX из оксобилана [46] использовали β -ацетоксиэтильные группы, которые превращали в винильные в результате щелочного гидролиза и дегидратации. Превращение β -карбметоксиаминоэтильных групп (в синтезе диметилового эфира протопорфина IX) осуществляли путем кислотного гидролиза и последующего расщепления по Гофману [47], а β -диэтиламиноэтильных групп [39] (в синтезе протопорфина IX) — расщеплением по Гофману. В качестве предшественника винильных групп использовали также β -карбоксивинильные группы.

ГЕМОГЛОБИН И МИОГЛОБИН

ГЕМОГЛОБИН

Гемоглобины — это целый ряд пигментов крови, простетическая группа которых, протогем, связана с белковой частью — глобином. Характерной особенностью этих пигментов является способность обратимо соединяться с кислородом. Гемоглобины чрезвычайно широко распространены в природе. Они имеются у всех позвоночных, за исключением некоторых бескровных рыб, у многих видов беспозвоночных, у некоторых простейших, у ряда штаммов дрожжей и плесневых грибов и даже в клубеньках бобовых растений.

Размер молекул гемоглобина у различных видов не одинаков. У рыб, амфибий, пресмыкающихся и птиц молекулярная масса гемоглобина 61 000—72 000, у млекопитающих — 66 000—68 000 (определен методом ультрацентрифугирования). Все эти гемоглобины построены из четырех полипептидных цепей, каждая из которых связана с одной группой гема. Однако у некоторых видов встречаются гемоглобины с меньшей молекулярной массой. У миксин (*Mixini*), класс круглоротых, гемоглобин имеет молекулярную массу 34 000 и, возможно, состоит из

двух полипептидных цепей. Молекула гемоглобина миноги (*Lampetra*) с молекулярной массой 17 000 содержит одну группу гема. Подобный же гемоглобин выделен из клубеньков бобовых растений, молекулярная масса его 17 500—19 500. Гемоглобин, выделенный из *Paramecium aurella*, имеет еще более низкую молекулярную массу (13 000) и содержит одну группу гема на молекулу гемоглобина.

Однако и в пределах одного вида гемоглобин состоит из нескольких компонент. Даже у одного индивидуума обычно существует ряд гемоглобинов. У человека кроме главной нормальной компоненты, Hb A, имеется еще фетальный гемоглобин, Hb F, и так называемая меньшая компонента, Hb A₂. Помимо трех нормальных гемоглобинов встречаются также аномальные, которых в настоящее время насчитывается несколько десятков.

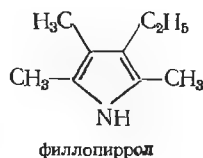
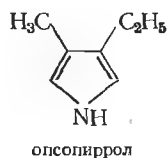
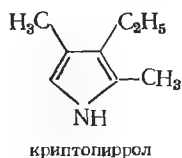
Похожий на гемоглобин белок имеется в мышечной ткани; это — миоглобин, или мышечный гемоглобин. Миоглобин, выделенный из различных видов, имеет молекулярную массу порядка 17 000 и состоит из одной полипептидной цепи, соединенной с одной группой гема. Простетическая группа у него та же — протогем.

Химия гемина

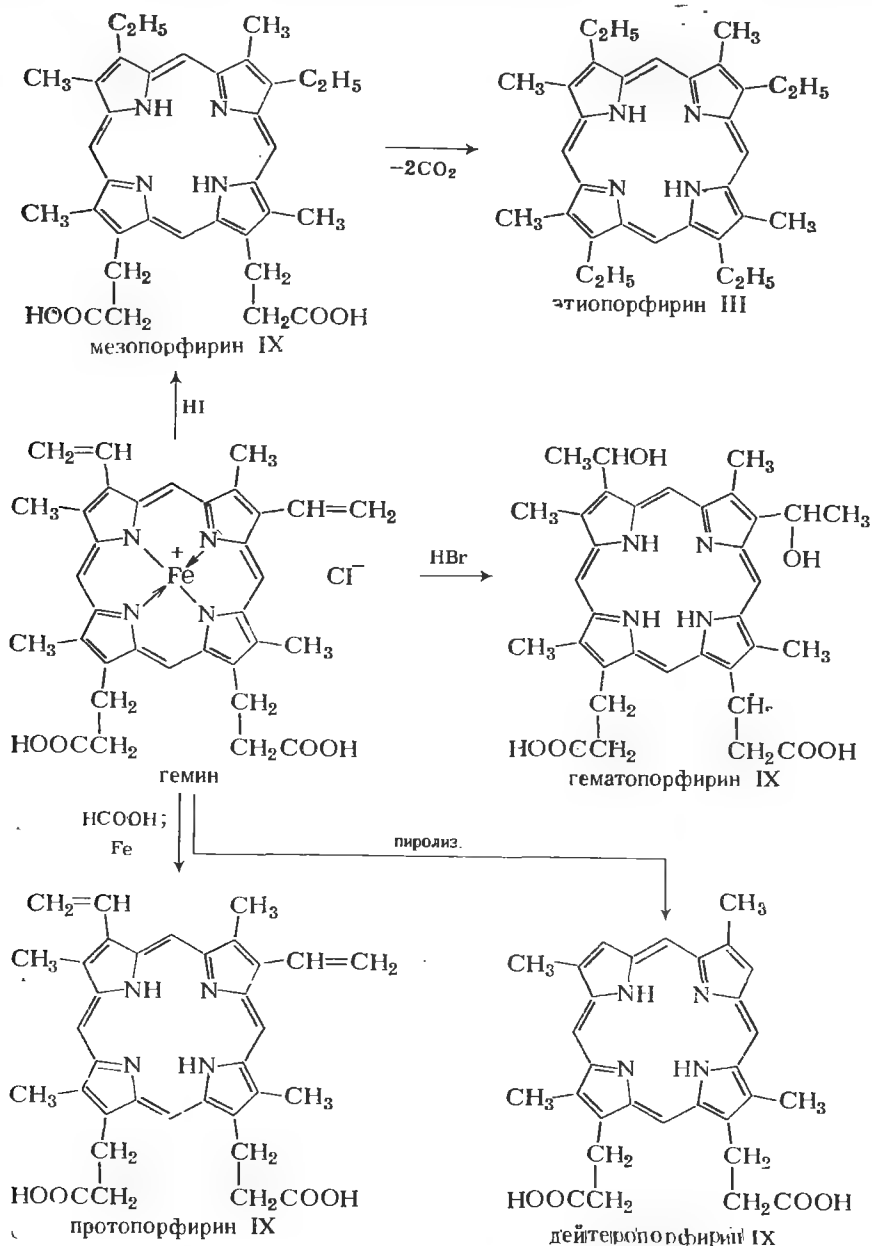
В кислой среде гем гемоглобина легко и обратимо отделяется от апопротейна; полипептидные цепи при этом могут быть выделены в чистом виде. Однако, для того чтобы выделить только простетическую группу, достаточно более грубой обработки: при нагревании цельной крови с уксусной кислотой и хлористым натрием удается получить кристаллы протогемина, или просто гемина; двухвалентное железо гема во время обработки окисляется в трехвалентное.

При обработке гемина иодистоводородной кислотой в уксусной кислоте образуется мезопорфирин IX; винильные группы гемина восстанавливаются в этильные. Если же вместо иодистоводородной кислоты взять бромистоводородную, получается гематопорфирин, содержащий две оксиэтильные группы вместо винильных. При декарбоксилировании мезопорфирина получается этиопорфирин. При пиролизе гемина в расплавленном резорцине винильные группы отщепляются, и последующее удаление железа приводит к дейтеропорфиру IX.

При энергичном восстановлении гемина иодистым водородом в уксусной кислоте получается смесь пирролов, из которой удается выделить четыре пиррольных производных — гемопиррол, криптопиррол, опсопиррол и филлопиррол:

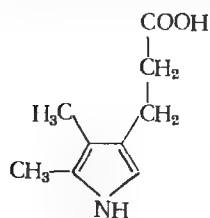


Железо из гемина можно удалить так, чтобы винильные группы остались незатронутыми. Так, при действии на гемин муравьиной кислотой в присутствии железных опилок удается выделить протопорфирин IX:

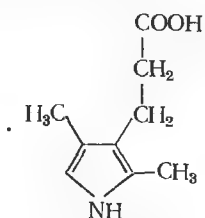


Из продуктов восстановления гемина оловом в соляной кислоте были выделены четыре пирролкарбоновые кислоты — гемо-, крипто-,

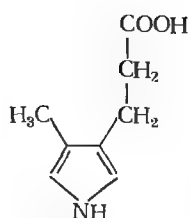
опсо- и филлопирролкарбоновые:



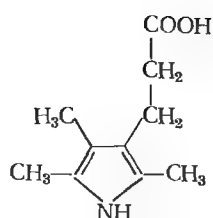
гемопирролкарбо-
новая кислота



криптопирролкарбо-
новая кислота

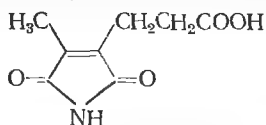


опсопирролкарбо-
новая кислота

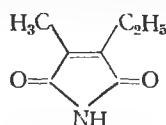


филлопирролкарбо-
новая кислота

При окислении гемина хромовым ангидридом в серной кислоте получается имида гематиновой кислоты; из продуктов окисления мезопорфирина кроме него удастся выделить метилэтилмалеинимид:



имида гематиновой кислоты



метилэтилмалеинимид

Строение продуктов распада гемина было выяснено следующим образом. Синтетический метилэтилмалеинимид, полученный из ацетоуксусного эфира, оказался идентичным природному. Строение имида гематиновой кислоты было доказано декарбоксилированием ее в метилэтилмалеинимид, а также выделением из продуктов ее окисления янтарной кислоты, что возможно только в том случае, если карбоксил стоит у β -углеродного атома этильной группы, и, наконец, синтезом.

Структуры гемо-, крипто-, опсо- и филлопирролов были выяснены путем превращения их в производные пиррола установленного строения и целого ряда взаимных превращений. Структура пирролкарбоновых кислот была установлена декарбоксилированием их в соответствующие пирролы и окислением в гематиновую кислоту.

Из молекулярной формулы гемина $C_{34}H_{32}O_4N_4FeCl$ видно, что он содержит четыре атома азота и, следовательно, четыре пиррольных кольца. Из сравнения структур продуктов восстановительного распада гемина следует, что α -положения пиррольных ядер или свободны, или содержат метильную группу — одноуглеродную единицу. Логично предположить, что пиррольные кольца в порфиринах связаны моноуглеродным мостиком, как это показано в формуле порфина, предложенной Кюстером в 1912 г. Другие формулы — тетрапиррилэтиленовая Вильштеттера и индигоидная Фишера — были отвергнуты после ряда синтезов, предпринятых Фишером для выяснения природы порфинового ядра. Исследования показали правильность формулы Кюстера.

Для установления относительного расположения заместителей в молекулах порфиринов, являющихся продуктами распада гемина, необходимо было идентифицировать природные продукты с веществами, полученными синтетически. Это оказалось затруднительным в случае этиопорфиринов, которые плавятся с разложением при высокой температуре, поэтому Фишер предпринял синтез некоторых мезопорфиринов. Изомер под номером IX оказался идентичен природному.

Полный синтез гемина, осуществленный в 1929 г. Г. Фишером, позволил окончательно установить его структуру [1].

Белковая часть гемоглобина человека, глобин, состоит из четырех полипептидных цепей, попарно идентичных [48]; это две α - и две β -цепи. α -Цепь имеет N-концевую последовательность Val-Leu, а β -цепь — Val—His—Leu.

Для выяснения аминокислотной последовательности полипептидных цепей денатурированный мочевиной глобин подвергали частичному расщеплению трипсином [49]. Полученные таким образом пептиды разделяли ионообменной хроматографией [50, 51]. Было выделено двадцать семь триптических пептидов — тринадцать из α -цепи и четырнадцать из β -цепи.

Аминокислотная последовательность небольших пептидов определялась химическими методами — динитрофенильным, деградацией по Эдману и гидразинолизом, а также расщеплением карбоксипептидазой. Триптические пептиды большой длины подвергались дальнейшему расщеплению другими протеолитическими ферментами — химотрипсином, пепсином или папаином; аминокислотная последовательность полученных меньших пептидов определялась обычными химическими методами (см. кн. I, стр. 83).

Определение полной аминокислотной последовательности всех триптических пептидов привело к установлению структурных формул α - и β -цепей гемоглобина человека (см. стр. 130).

В последующих работах выделенные из нормального человеческого глобина и разделенные методом противоточного распределения α - и β -цепи подвергались расщеплению трипсином, химотрипсином и пепсином. Идентификация полученных пептидов, определение их аминокислотного состава, C- и N-концевых групп полностью подтвердили предложенную ранее структуру α - и β -цепей.

Определение полной химической структуры позволило уточнить молекулярные массы полипептидных цепей и молекулы глобина в целом.

Глобин $\alpha_2\beta_2$ имеет молекулярную массу 61 990 (при определении с помощью центрифуги 66 000—68 000) [52] и состоит из 574 аминокислот.

Электрофорез гемоглобина, выделенного из эритроцитов нормально-го человека, при $pH < 7$ показывает присутствие трех компонент: основная (90%) — гемоглобин А (Hb A), минорная компонента, движущаяся медленнее Hb A, — гемоглобин A_2 (2—3%) и, наконец, минорная компонента, движущаяся быстрее Hb A, — Hb A_3 , содержание которого составляет 3—10% и увеличивается при старении красных кровяных телец [53]. Присутствие минорных компонент в гемоглобине подтверждается данными хроматографии.

Молекула гемоглобина A_2 состоит из четырех полипептидных цепей: две α -цепи, те же, что и в гемоглобине А, и две цепи, отличные от β -цепей и названные δ -цепями. Формулу Hb A_2 , таким образом, можно изобразить как $\alpha_2\delta_2$. Сопоставление триптических гидролизатов Hb А и Hb A_2 показало, что δ -цепь отличается от β -цепи по меньшей мере четырьмя аминокислотными остатками [54], которые впоследствии были идентифицированы: Ala в δ -цепи вместо Clu в β -цепи, Thr (δ -) — вместо Ser (β -), Asp (δ -) вместо Thr (β -) и Ser (δ -) — вместо Thr (β -). Hb A_2 обладает значительно большим сродством к кислороду, чем Hb А, поэтому в случае некоторых заболеваний (например, талассемии, когда организм страдает от недостатка кислорода) его количество может увеличиваться вдвое по сравнению с нормальным содержа-

Val—Leu—Ser—Pro—Ala—Asp—Lys—Thr—Asn—Val—Lys—Ala—Ala—Try—Gly—Lys—
10

Val—Gly—Ala—His—Ala—Gly—Glu—Tyr—Gly—Ala—Glu—Ala—Leu—Glu—Arg—Met—
20 30

Phe—Leu—Ser—Phe—Pro—Thr—Thr—Lys—Thr—Tyr—Phe—Pro—His—Phe—Asp—Leu—
40

Ser—His—Gly—Ser—Ala—Gln—Val—Lys—Gly—His—Gly—Lys—Lys—Val—Ala—Asp—
50 60

Ala—Leu—Thr—Asn—Ala—Val—Ala—His—Val—Asp—Asp—Met—Pro—Asn—Ala—Leu—
70 80

Ser—Ala—Leu—Ser—Asp—Leu—His—Ala—His—Lys—Leu—Arg—Val—Asp—Pro—Val—
90

Asn—Phe—Lys—Leu—Leu—Ser—His—Cys—Leu—Leu—Val—Thr—Leu—Ala—Ala—His—
100 110

Leu—Pro—Ala—Glu—Phe—Thr—Pro—Ala—Val—His—Ala—Ser—Leu—Asp—Lys—Phe—
120

Leu—Ala—Ser—Val—Ser—Thr—Val—Leu—Thr—Ser—Lys—Tyr—Arg
130 140 141

α-цепь

Val—His—Leu—Thr—Pro—Glu—Glu—Lys—Ser—Ala—Val—Thr—Ala—Leu—
10

Try—Gly—Lys—Val—Asn—Val—Asp—Glu—Val—Gly—Gly—Glu—Ala—Leu—
20

Gly—Arg—Leu—Leu—Val—Val—Tyr—Pro—Try—Thr—Gln—Arg—Phe—Phe—
30 40

Glu—Ser—Phe—Gly—Asp—Leu—Ser—Thr—Pro—Asp—Ala—Val—Met—Gly—
50

Asn—Pro—Lys—Val—Lys—Ala—His—Gly—Lys—Lys—Val—Leu—Gly—Ala—
60 70

Phe—Ser—Asp—Gly—Leu—Ala—His—Leu—Asp—Asp—Leu—Lys—Gly—Thr—
80

Phe—Ala—Thr—Leu—Ser—Gln—Leu—His—Cys—Asp—Lys—Leu—His—Val—
90

Asp—Pro—Gln—Asp—Phe—Arg—Leu—Leu—Gly—Asn—Val—Leu—Val—Cys—
100 110

Val—Leu—Ala—His—His—Phe—Gly—Lys—Glu—Phe—Thr—Pro—Pro—Val—
120

Gln—Ala—Ala—Tyr—Gln—Lys—Val—Val—Ala—Gly—Val—Ala—Asp—Ala—
130 140

Leu—Ala—His—Lys—Tyr—His
146

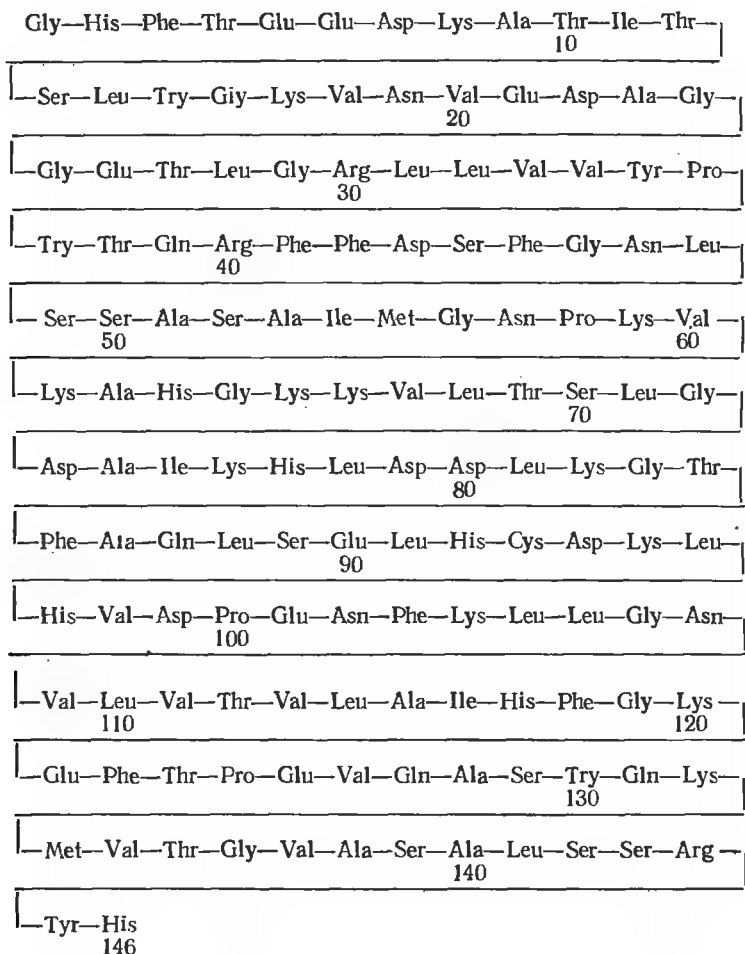
β-цепь

нием. Однако известны случаи пониженного содержания Hb A₂ и даже полного его отсутствия. Эти факты показывают, что Hb A₂ является не побочным продуктом и не продуктом катаболизма Hb A, а синтезируется под самостоятельным генетическим контролем.

Гемоглобин A₃ отличается от Hb A строением β-цепи.

В крови всех здоровых людей находится также в небольшом количестве фетальный гемоглобин Hb F. Этот гемоглобин составляет основную часть гемоглобина зародыша, откуда и происходит его название (*fetus* — зародыш, эмбрион), однако уже у новорожденного значительная часть его заменяется гемоглобином A, а через несколько месяцев после рождения Hb F составляет уже совсем небольшую часть от общего содержания гемоглобина (0,3—0,4%).

Как показали исследования последних лет, Hb F состоит из двух α-цепей, идентичных α-цепям Hb A, и двух одинаковых полипептидных цепей, отличающихся от β-цепей Hb A по составу и аминокислотной последовательности. Они были названы γ-цепями. Формула Hb F может быть написана в виде α₂γ₂^F. Была определена первичная структура γ-цепи:



Оказалось, что она в основном совпадает с первичной структурой β -цепи (см. стр. 130), однако некоторые аминокислоты заменены другими; встречается также инверсия чередования аминокислотных остатков (в положениях 21 и 22 последовательность Asp—Glu β -цепи заменена последовательностью Glu—Asp в γ -цепи).

Гемоглобины животных значительно отличаются от гемоглобина человека по аминокислотному составу. Однако все они успешно выполняют функцию транспорта кислорода. Несмотря на различия в аминокислотном составе вторичная и третичная структуры гемоглобинов из различных источников подобны. N-Концевые аминокислоты у ряда гемоглобинов также одинаковы.

Хотя и в γ , и в δ -цепях ряд аминокислот заменен другими, как Hb F, так и Hb A₂ успешно выполняют те же самые физиологические функции, что и Hb A. Однако в некоторых случаях замена только одной аминокислоты ведет к резкому изменению физико-химических свойств молекулы, что в свою очередь приводит к тяжелым физиологическим последствиям.

Аномальные гемоглобины. Замена аминокислоты может иметь место как в α -, так и в β -цепи. Аномальные гемоглобины [53], получающиеся в результате этой замены, отличаются от Hb A поведением при электрофорезе и хроматографии на карбоксиметилцеллюлозе и могут быть таким образом идентифицированы и выделены.

Так, например, была определена структура Hb S, имеющего большую электрофоретическую подвижность, чем Hb A, и отличающегося от Hb A тем, что у него в положении 6 β -цепи глутаминовая кислота заменена валином; формула этого гемоглобина $\alpha_2^A\beta_2^{6Val}$. В Hb G ($\alpha_2^A\beta_2^{7Gly}$) глутаминовая кислота в положении 7 заменена глицином; в Hb E ($\alpha_2^A\beta_2^{26Lys}$) глутаминовая кислота в положении 26 — лизином; в Hb «Цюрих» ($\alpha_2^A\beta_2^{63Arg}$) гистидин в положении 63 — аргинином. Возможны замещения аминокислот и в α -цепи.

Приведенные выше аномальные гемоглобины являются модификациями Hb A, так как их молекулы содержат видоизмененные α - или β -цепи. Однако нарушения в синтезе α -цепи вызывают появление модификаций и других нормальных компонент гемоглобина человека, т. е. появления аномальных гемоглобинов F и A₂. Действительно, известны аномальный гемоглобин A₂, так называемый гемоглобин Russ (Hb Russ), содержащий видоизмененную α -цепь ($\alpha_2^{Russ}\delta_2$), и аномальный фетальный гемоглобин с модифицированной α -цепью ($\alpha_2^F\gamma_2$).

Нарушения в синтезе γ - и δ -цепей также приводят к аномальным гемоглобинам F и A₂. Примером аномальной компоненты A₂ с измененной δ -цепью является Hb B₂ ($\alpha_2\delta^{B_2}$) и Hb flat ($\alpha_2\delta^{flat}$).

Существуют аномальные гемоглобины, которые содержат только β - или γ -цепи и совсем не имеют α -цепей, например Hb H (β_4^A) и Hb Барта (γ_4^F).

Структура молекулы гемоглобина

Рентгеноструктурные исследования последних лет внесли почти полную ясность в структуру Hb A [55] и другого близко родственного ему дыхательного гемопротеида — миоглобина [56].

Изучение строения молекулы гемоглобина методом рентгеноструктурного анализа было проведено Перутцем с сотрудниками [57] на примере оксигемоглобина лошади. Молекула гемоглобина лошади

представляет собой в первом приближении сфероид с длиной 6,4 нм, шириной 5,5 нм и высотой 5,0 нм*. Она состоит из четырех субъединиц, попарно идентичных, — двух α - и двух β -полипептидных цепей.

При помощи рентгеноструктурного анализа с разрешением 0,55 нм удается проследить общее расположение в пространстве каждой полипептидной цепи (третичная структура) (рис. 10). Конфигурации обоих видов полипептидных цепей почти одинаковы. Однако еще более поразительным является то, что эта сложная и неправильная форма полипептидной цепи почти целиком совпадает с конфигурацией молекулы миоглобина, определенной ранее.

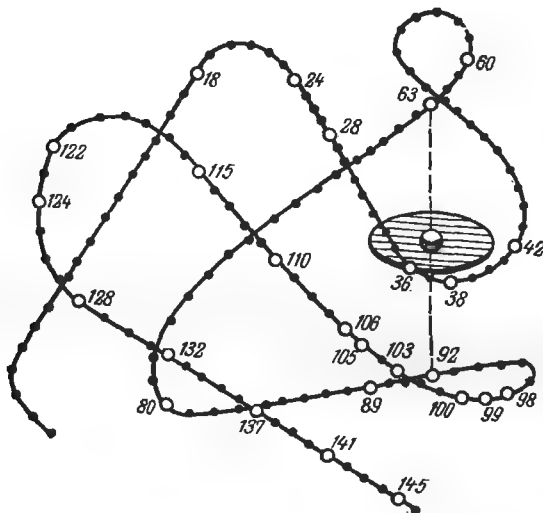


Рис. 10. Третичная структура β -цепи гемоглобина.

Как α , так и β -полипептидные цепи состоят из восьми спиралей, соединенных неспиральными участками (вторичная структура) (рис. 11). Именно в местах неспиральных участков полипептидная цепь делает повороты, в результате чего и возникает сложная пространственная структура (третичная структура). Для указания структурного положения аминокислотных остатков в определенных участках полипептидной цепи эти участки обозначают буквами: спиральные участки — латинскими буквами от *A* до *H*, начиная с *N*-конца, неспиральные — двумя буквами, указывающими спирали, которые они соединяют (например, *BC*, *EF*), неспиральные *N*- и *C*-концевые участки — соответственно *NA* и *HC*. Остатки внутри каждого спирального и неспирального участка нумеруют с *N*-конца. Обозначение Lys *E* 10 (66) показывает, что в 66 положении β -цепи находится остаток лизина, который занимает 10 место в спирали *E*.

Группа гема лежит в «кармане», образованном складками полипептидной цепи, между спиралями *F* и *E*.

Данные рентгеноструктурного анализа с разрешением 0,28 нм позволяют локализовать практически все атомы молекулы гемоглобина и выявить тонкие детали взаимодействия гема с полипептидной цепью,

* 1 нм = 10^{-9} м.

а также самих полипептидных цепей [58]. Неполарные заместители гема находятся внутри клубка полипептидной цепи в окружении неполярных аминокислотных остатков, а карбоксильные группы — у поверхности и, таким образом, взаимодействуют с водой. Гем удерживается в кармане полипептидной цепи (*F* 8) координационной связью между железом гема и азотом имидазола ближайшего гистидина (87 α и 92 β), так называемого проксимального гистидина. Кроме того, группа гема удерживается за счет неполярных взаимодействий с полипептидной цепью. Между гемом и полипептидной цепью имеется около 60 контактов, причем все они, за исключением одного в α -цепи и двух в β -цепи, являются неполярными. Полярные взаимодействия включают карбоксил остатка пропионовой кислоты гема и His *CD* 3 (45) в α -цепи и контакты карбоксильных групп с Ser *CD* 3 (44) и Lys *E* 10 (66)

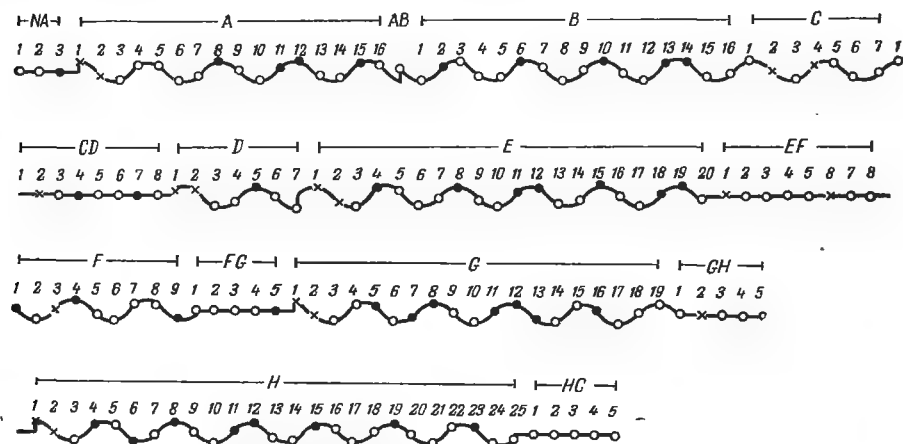


Рис. 11. Вторичная структура глобина:

волнистой линией показаны α -спиральные участки, прямой линией — неспиральные участки; ● — неполярные остатки аминокислот; X — пролины или комбинация пролина с серином и треонином, аспарагиновой кислотой или аспарагином; O — остальные аминокислотные остатки.

в β -цепи. С противоположной стороны от проксимального гистидина, между железом гема и His *E* 7 и Val *E* 11, в кармане полипептидной цепи имеется свободное пространство; в α -цепи это пространство достаточно велико и в него свободно входит молекула кислорода; в β -цепи, напротив, мало, и для реакции с кислородом необходимо изменение конформации полипептидной цепи.

Свертывание полипептидной цепи обусловлено распределением полярных и неполярных аминокислотных остатков между поверхностью молекулы и ее внутренней частью. Во внутреннем пространстве молекулы находятся неполярные аминокислотные остатки (аланин, валин, лейцин, фенилаланин и др.), на поверхности лежат электрически заряженные или полярные группы. Такая упаковка боковых групп обеспечивает наименьшую свободную энергию белковой молекулы. Дополнительный вклад в стабилизацию конфигурации полипептидной цепи вносит группа гема.

Четвертичная структура гемоглобина (т. е. расположение четырех полипептидных цепей относительно друг друга), разработанная Перутцем с сотр. на основе рентгеноструктурного анализа, показана на

рис. 12. В центре молекулы имеется достаточно широкое отверстие, через которое могут проходить молекулы воды и электролитов. N-Концы полипептидных цепей выходят к вершинам молекулы, а С-концы спрятаны в ее глубине; α - и β -цепи имеют многочисленные контакты, которые удерживают их вместе. Наиболее многочисленны $\alpha_1\beta_1$ -контакты, которые включают около 110 атомов 34 аминокислотных остатков; подавляющее большинство из них является неполярными. Контакты $\alpha_1\beta_2$ включают около 80 атомов 19 аминокислотных остатков, причем взаимодействия также в основном являются неполярными.

Четвертичные структуры окси- и дезоксигемоглобинов различны: можно говорить об окси- (*R*-) и дезокси- (*T*) конформациях*. Повышенная устойчивость дезокси-конформации достигается за счет солевых мостиков: α -карбоксил аргинина *HC 3* (141) α_1 связан с α -аминогруппой валина *NA 1* (1) α_2 , а его гуанидиниевая группа — с остатком аспарагиновой кислоты *H 9* (126) α_2 ; α -карбоксил гистидина *HC 3* (146) β_1 взаимодействует с ϵ -аминогруппой лизина *C 5* (40) α_2 , а его имидазольный цикл — с остатком аспарагиновой кислоты *FG 1* (94) β_1 . Все четыре остатка тирозина, находящиеся на предпоследних местах в полипептидных цепях, удерживаются в «карманах» между спиралями *F* и *H* частично силами Ван-дер-Ваальса, частично водородными связями между гидроксильными группами тирозина и карбонильной группой валина *FG 5*. Дополнительный мостик образуется в результате внедрения молекулы дифосфоглицериновой кислоты между двумя β -субъединицами.

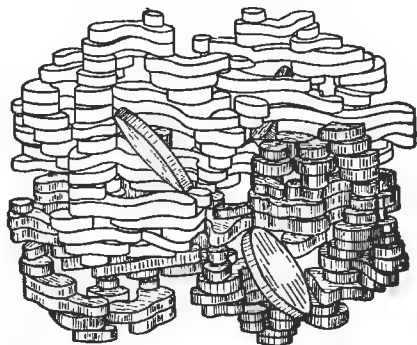


Рис. 12. Трехмерная модель молекулы гемоглобина:
светлые блоки — α -цепи; заштрихованные блоки — β -цепи; диск — группа гема.

Физиологические функции гемоглобина

Важнейшей функцией гемоглобина является перенос кислорода от легких к различным тканям. Эта функция основана на уникальном свойстве гемоглобина — способности обратимо соединяться с кислородом. В процессе эволюции полипептидных цепей молекула гемоглобина приобрела не только это свойство, но и ряд дополнительных механизмов, позволяющих достигать максимального насыщения кислородом в легких и максимальной отдачи его в тканях. Такими механизмами являются гем-гемное взаимодействие и эффект Бора.

Реакция гемоглобина с кислородом протекает по суммарному уравнению:



При полном насыщении 1 г гемоглобина соединяется с 1,33 мл кислорода. При физиологических условиях гемоглобин крови, однако, на-

* *T* — от слова «tense» — напряженное состояние с большой энергией взаимодействия, *R* — от слова «relaxed» — релаксированное, расслабленное состояние с меньшей энергией взаимодействия.

сыщен кислородом не полностью, а примерно на 95%. Количество кислорода, соединяющегося с данным количеством гемоглобина, зависит от его парциального давления (рис. 13). Форма кривой насыщения Нб кислородом не гиперболоидная, как в случае миоглобина и как следовало ожидать из уравнения 1, а сигмоидная. На положение и форму этой кривой влияют температура и рН раствора, а также парциальное давление двуокиси углерода (рис. 14). В легких, где парциальное давление кислорода относительно велико (106 мм рт. ст.), а CO_2 — мало (40 мм рт. ст.), гемоглобин насыщается кислородом, а в тканях, где существует обратное соотношение ($P_{\text{O}_2}=30$ мм рт. ст., $P_{\text{CO}_2}=50$ мм рт. ст.), оксигемоглобин легко диссоциирует на кислород и гемоглобин, причем в большей степени, чем в отсутствие CO_2 .

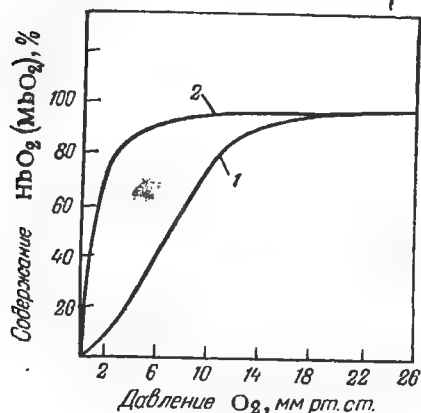


Рис. 13. Кривые насыщения гемоглобина (1) и миоглобина (2) кислородом.

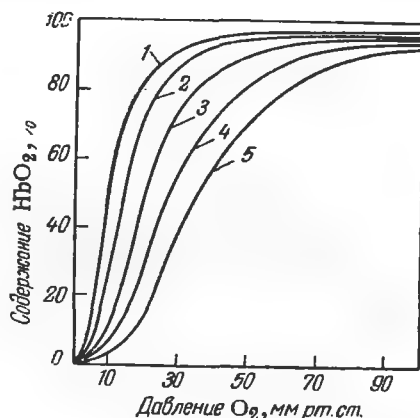


Рис. 14. Кривые насыщения кислородом цельной крови при различных парциальных давлениях CO_2 :
1 — $P_{\text{CO}_2}=0$; 2 — $P_{\text{CO}_2}=3$ мм рт. ст.;
3 — $P_{\text{CO}_2}=20$ мм рт. ст.; 4 — $P_{\text{CO}_2}=40$ мм рт. ст.; 5 — $P_{\text{CO}_2}=90$ мм рт. ст.

Реакции с кислородом каждой из четырех групп гема, входящих в состав гемоглобина, взаимосвязаны: соединение с кислородом одной группы гема увеличивает сродство к кислороду других групп. Этот эффект получил название *гем-гемного взаимодействия*. Именно гем-гемное взаимодействие обуславливает, в основном, сигмоидную форму кривых насыщения, которая способствует наиболее эффективному переносу кислорода. Физиологическая роль гем-гемного взаимодействия заключается в основном не столько в увеличении сродства к кислороду при последовательном присоединении молекул кислорода к гемоглобину в легких, сколько в понижении этого сродства при последовательной диссоциации молекул кислорода в тканях. Это особенно важно потому, что парциальное давление кислорода в тканях не намного ниже, чем в легких. Если бы кривая насыщения гемоглобина кислородом имела гиперболоидную форму, в тканях освобождалась бы очень небольшая часть переносимого кислорода; это приводило бы к гибели организма от удушья даже в атмосфере чистого кислорода.

Группы гема в гемоглобине не могут взаимодействовать непосредственно из-за слишком большого расстояния между ними (2,5—3,7 нм);

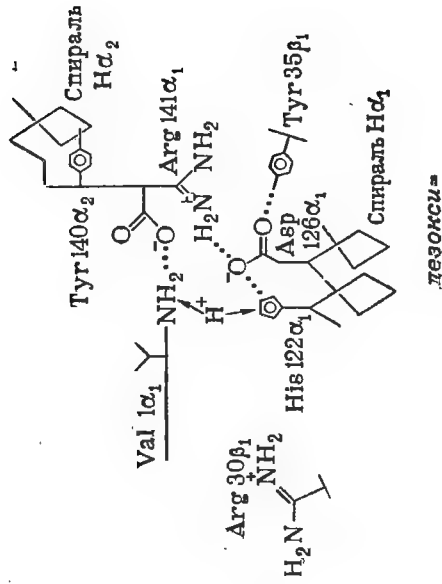
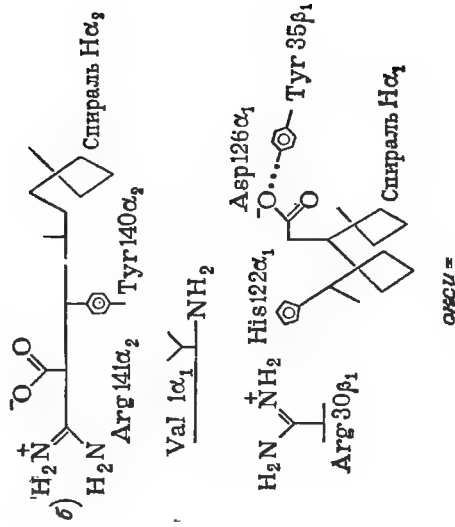
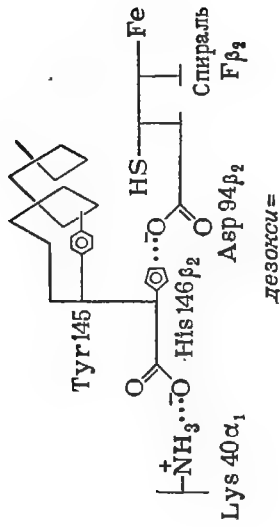
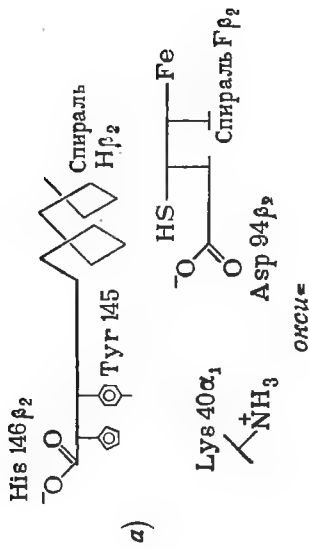
это взаимодействие является, вероятно, аллостерическим. Рентгеноструктурный анализ окси- и дезоксигемоглобинов показал, что при оксигенировании происходит значительное изменение четвертичной структуры молекулы гемоглобина. Гем-гемное взаимодействие связано именно с переходом *дезокс*-конформации в *окси*-конформацию при оксигенировании.

Данные рентгеноструктурного анализа позволяют представить наиболее вероятный механизм оксигенирования гемоглобина и связанных с ним эффектов [59]. Вначале, по-видимому, происходит оксигенирование одной из α -цепей. Поскольку при соединении с кислородом железо переходит из высокоспинового ($S=2$) в низкоспиновое ($S=0$) состояние, уменьшается его ковалентный радиус и ион железа перемещается в плоскость порфинового ядра; вместе с ним приближается к группе гема (приблизительно на 0,08 нм) жестко связанный с железом проксимальный гистидин. Смещение гистидина, находящегося в спиральном участке F полипептидной цепи, вызывает перемещение всей спирали F к центру молекулы, что в свою очередь приводит к уменьшению полости между спиралями F и H , в которой находился остаток Туг $HC\ 2$ (140) α_1 , в результате чего этот остаток выталкивается из полости. Выталкивание тирозина приводит к перемещению С-концевого Arg $HC\ 3$ (141) α_2 и разрыву двух солевых мостиков со второй α -субъединицей.

Второй стадией процесса является реакция с кислородом второй α -субъединицы: выталкивание тирозина из щели между спиралями F и H , перемещение Arg $HC\ 3$ (141) α_2 и разрыв солевых мостиков между аргинином и α_1 -субъединицей.

К этому моменту четыре из шести солевых мостиков, скрепляющих тетрамер дезоксигемоглобина, оказываются разорванными и тетрамер относительно легко переходит в *окси*-конформацию. При этом разрываются остальные солевые мостики — между Lys $C\ 5$ (40) α и His $HC\ 3$ (146) β и дифосфолицератом (ДФГ) и двумя β -субъединицами. Гемы и их непосредственное окружение в α -субъединицах имеют *окси*-конформацию, а в β -цепях — *дезокс*-конформацию. Туг $HC\ 2$ (145) β все еще находится в карманах между спиралями F и H , а та сторона гема, где должен присоединяться кислород, блокирована Val $E\ 11$ (67) β . При переходе в *окси*-конформацию снижается вдвое энергия активации, необходимая для выталкивания Туг $HC\ 3$ (146) β из их карманов, так как при этом разрушаются солевые мостики между С-концевыми гистидинами и α -субъединицами, и остатки тирозина удерживаются на месте только внутренними солевыми мостиками между С-концевыми гистидинами и остатками аспарагиновой кислоты той же β -цепи. Это приводит к увеличению сродства к кислороду гемов β -цепей. Далее, атомы железа гемов β -цепей реагируют с кислородом, причем каждая реакция сопровождается выталкиванием тирозина и разрушением одного из внутренних солевых мостиков.

Еще один механизм, способствующий наиболее эффективному переносу кислорода гемоглобином, — *эффект Бора*. Он заключается в изменении сродства гемоглобина к кислороду в зависимости от рН. При рН выше 6,0 гемоглобин присоединяет протоны (из среды) и освобождает кислород. Эффект Бора играет в организме двоякую роль. При освобождении кислорода в тканях гемоглобин нейтрализует протоны, образующиеся в крови при поглощении CO_2 , чем облегчается транспорт CO_2 из тканей в легкие. Кроме того, при $pH < 6$ понижается



средство гемоглобина к кислороду, что способствует более эффективному освобождению кислорода в тканях, где содержание бикарбоната и молочной кислоты высокое.

Подобно гем-гемному взаимодействию эффект Бора возникает в результате изменения четвертичной структуры молекулы гемоглобина в процессах оксигенирования и дезоксигенирования. При оксигенировании вследствие разрыва солевых мостиков происходит выделение протонов, а при дезоксигенировании в результате образования солевых мостиков — поглощение (нейтрализация). Механизм этого явления показан на стр. 138.

В оксигемоглобине гистидин 146 β_2 , аспарагиновая кислота 94 β_2 и лизин 40 α_1 находятся далеко друг от друга и не взаимодействуют (а). Изменение четвертичной структуры в дезоксигемоглобине приводит к образованию солевого мостика между аспарагиновой кислотой и имидазольным кольцом гистидина. Этот мостик дополнительно стабилизируется образованием еще одного мостика между С-концевым карбоксилем гистидина β_2 -цепи и аминогруппой лизина 40 α_1 .

Аналогичный эффект наблюдается в другом месте контакта субъединиц (б). В оксигемоглобине Val 1 α_1 и Arg 141 α_2 не взаимодействуют, His 122 α_1 сближен с Arg 30 β_1 и Asp 126 α_1 связан водородной связью с Tyr 35 β_1 . В дезоксигемоглобине Val 1 α_1 находится в контакте с карбоксильной группой Arg 141 α_2 , Asp 126 α_1 образует контакты с His 122 α_1 , Tyr 35 β_1 и Arg 30 β_1 . Таким образом, возникающие солевые мостики стабилизируют протонированные Val 1 α_1 или His 122 α_1 .

МИОГЛОБИН

Миоглобин (Mb) является сложным белком, входящим в состав мышц большинства животных организмов. Его молекула состоит из одной полипептидной цепи, связанной с одной группой протогема. Атом двухвалентного железа, входящий в состав гема, способен соединяться с кислородом. Однако в отличие от гемоглобина миоглобин дезоксигенируется при значительно более низких парциальных давлениях кислорода, что позволяет ему выполнять функцию резервного источника кислорода в мышцах. Единственная полипептидная цепь миоглобина состоит из 153 аминокислотных остатков. Такая относительная несложность молекулы миоглобина, доступность его из разнообразных источников, а также способность образовывать кристаллы позволили в короткий срок определить аминокислотную последовательность и полную структуру молекулы этого белка. Строение миоглобина стало известно благодаря работам Эдмундсона и Хирса, изучавших аминокислотную последовательность белка, и Кендрию с сотрудниками, которые провели рентгеноструктурный анализ миоглобина кашалота, используя метод изоморфного замещения, впервые примененный Перутцем с сотрудниками в изучении гемоглобина.

Сущность этого метода заключается во введении в строго определенные участки полипептидной цепи белка атомов тяжелых металлов (например, атомов ртути) и сравнении рентгенограмм кристаллов свободного белка и изоморфных замещенных структур. Расшифровка получаемых карт электронной плотности позволяет создать трехмерную картину молекулы белка. Поскольку молекула миоглобина не имеет сульфгидрильных групп, которые могли бы быть использованы для получения ртутных производных, было использовано свойство миоглобина

да, связанная водородной связью с другим гистидиновым остатком полипептидной цепи. Упрочнению структуры молекулы способствуют также водородные связи между остатками пропионовой кислоты гема и боковыми цепями белка, одной из которых может быть аргинин. Роль полярных групп боковых цепей миоглобина заключается, вероятно, еще и в том, что, взаимодействуя со свободными аминогруппами на последних витках спиральных сегментов, они могут определять места, в которых спираль нарушается и переходит в неспиральный участок цепи.

Как уже указывалось, в результате рентгеноструктурного анализа миоглобина все же не удалось строго определить положение некоторых аминокислотных остатков в его молекуле. Однако большая часть из них была идентифицирована А. Д. Эдмундсоном [61] путем расщепления молекулы миоглобина бромистым цианом, который селективно разрывает связи у метиониновых остатков. Структуры выделенных при этом пептидов приведены ниже:

Val—Leu—Ser—Glu—Gly—Glu—Try—Gln—Leu—Val—Leu—His—Val—
10

Try—Ala—Lys—Val—Glu—Ala—Asp—Val—Ala—Gly—His—Gly—Gln—
20

Asp—Ile—Leu—Ile—Arg—Leu—Phe—Lys—Ser—His—Pro—Glu—Thr—
30

Leu—Glu—Lys—Phe—Asp—Arg—Phe—Lys—His—Leu—Lys—Thr—Glu—
40 50

Ala—Glu—Met
55

пептид 1

Lys—Ala—Ser—Glu—Asp—Leu—Lys—Lys—His—Gly—Val—Thr—Val—Leu—Thr—
56 60 70

Ala—Leu—Gly—Ala—Ile—Leu—Lys—Lys—Lys—Gly—His—His—Glu—
80

Ala—Glu—Leu—Lys—Pro—Leu—Ala—Gln—Ser—His—Ala—Thr—Lys—
90

His—Lys—Ile—Pro—Ile—Lys—Tyr—Leu—Glu—Phe—Ile—Ser—Glu—
100

Ala—Ile—Ile—His—Val—Leu—His—Ser—Arg—His—Pro—Gly—Asn—
110 120

Phe—Gly—Ala—Asp—Ala—Gln—Gly—Ala—Met
130 131

пептид 2

Asn—Lys—Ala—Leu—Glu—Leu—Phe—Arg—Lys—Asp—Ile—Ala—Ala—
132 140

Lys—Tyr—Lys—Glu—Leu—Gly—Tyr—Gln—Gly
150 153

пептид 3

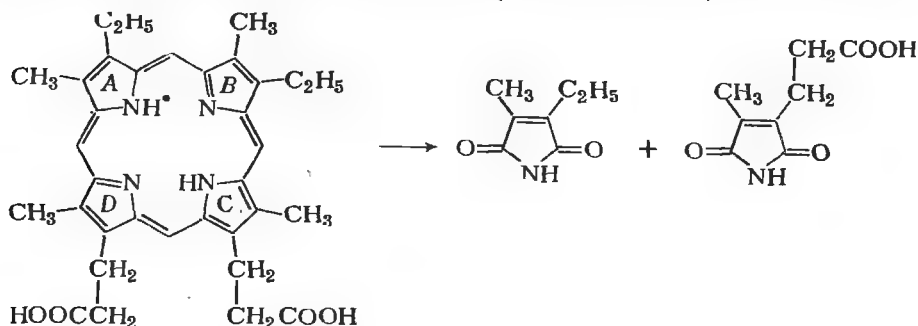
Рентгеноструктурное изучение взаимодействия миоглобина с ионами металлов и выявление сущности происходящих при этом конформаци-

онных изменений способствуют пониманию таких важнейших биохимических процессов, как активация ферментов металлами и отравление ферментов.

Известны аномальные человеческие миоглобины, но их число значительно меньше, чем в случае гемоглобина. В настоящее время исследованы два генетических варианта — Mb Aberdeen и Mb Appapalis, отличающиеся от нормального Mb отсутствием остатка аргинина вблизи С-концевой части молекулы.

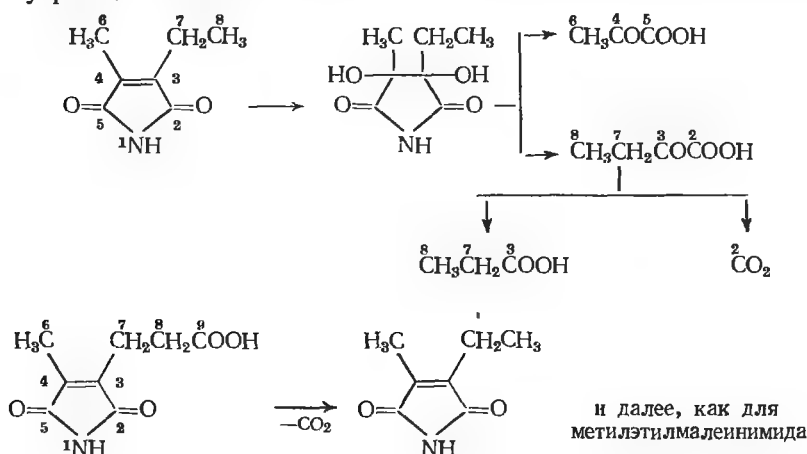
БИОСИНТЕЗ И КАТАБОЛИЗМ ГЕМОГЛОБИНА

Биосинтез порфиринов. Исследования синтеза порфиринов в организме начались в 1946 г., когда было показано, что азот глицина, меченного ^{15}N , внедряется в гем, и, таким образом, глицин является одним из предшественников гема в организме. Была определена последовательность реакций, в результате которой можно установить, в какое именно положение протопорфирина IX внедряются С- или N-атомы предшественника. Мезопорфирин IX, полученный из гемина, при окислении хромовой кислотой давал 2 моль метилэтилмалеинимида (из колец А и В) и 2 моль имида гематиновой кислоты (из колец С и D):



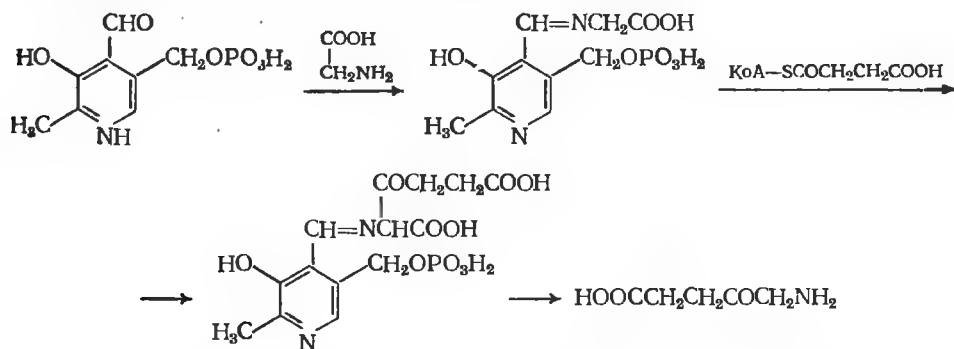
Оказалось, что содержание ^{15}N в метилэтилмалеинимиде (А+В) и имида гематиновой кислоты (С+D) приблизительно одинаково, т. е. все атомы азота порфиринового ядра происходят от азота глицина.

Для выявления предшественников углеродных атомов порфирина метилэтилмалеинимид и имида гематиновой кислоты подвергали дальнейшему расщеплению:



Определяя радиоактивность $^{14}\text{CO}_2$, выделившегося на различных стадиях деградации, можно судить, в какое положение внедрялся ^{14}C . Опыты с глицином, меченным ^{14}C , показали, что углерод метиленовой группы глицина внедряется в положения 4, 9, 14, 16 колец *A*, *B*, *C* и *D* порфинового ядра и образует, кроме того, все четыре метеновых мостика, но карбоксильная группа глицина не участвует в образовании порфирина. Остальные двадцать шесть углеродных атомов молекулы протопорфирина образуются из метильной и карбоксильной групп уксусной кислоты; однако из распределения активности в молекуле протопорфирина видно, что уксусная кислота участвует в биосинтезе порфиринов в виде какой-то четырехуглеродной единицы. Как было показано, такой четырехуглеродной единицей является янтарная кислота, возникающая из ацети-кофермента *A* в цикле трикарбоновых кислот (см. стр. 399). Лимонная и α -кетоглутаровая кислоты, лежащие на пути превращения уксусной кислоты в янтарную в этом цикле, таким образом, также участвуют в биосинтезе порфиринов.

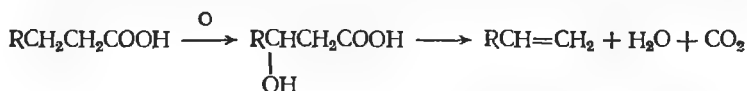
Дальнейшие выводы относительно того, как глицин и янтарная кислота участвуют в образовании порфиринов, можно сделать из факта, что δ -аминолевулиновая кислота также является предшественником гема в организме. Глицин и янтарная кислота превращаются в δ -аминолевулиновую кислоту под действием фермента синтетазы δ -аминолевулиновой кислоты. Карбоксильная группа сукцинилкофермента *A*, активированная тиоэфирной связью, реагирует с метиленовой группой глицина, которая также активирована в результате образования шиффова основания между NH_2 -группой глицина и пиридоксальфосфатом. Образующееся пиридоксальфосфатпроизводное α -амино- β -кетoadипиновой кислоты самопроизвольно декарбоксилируется и после омыления шиффова основания получается δ -аминолевулиновая кислота:



Известно, что замещенный пиррол, порфобилиноген, является предшественником порфиринов в целом ряде систем. Порфобилиноген легко получается *in vivo* при аутоконденсации двух молекул δ -аминолевулиновой кислоты под действием дегидратазы δ -аминолевулиновой кислоты (конденсация, подобная конденсации по Кнорру).

Первым порфирином, образующимся *in vivo* из порфобилиногена, является уропорфирин III, а в некоторых случаях уропорфирин I. Уропорфирин III, однако, не является непосредственным продуктом аутоконденсации порфобилиногена, а возникает из легко окисляющегося гексагидропорфирина — уропорфириногена III [62]. Сам уропорфирин III способен превращаться в протопорфирин IX в живых системах лишь

пионовой кислоты в положениях 2 и 4 необходимо превратить в винильные группы и окислить гексагидропорфириновую систему в порфириновую. Предполагают, что превращение остатков пропионовой кислоты идет через стадию образования β -оксипропионовой кислоты:



Эти процессы протекают под действием ферментов, связанных с митохондриями.

На стадии протопорфирина происходит разветвление путей биосинтеза порфиринов в животных и растительных организмах. У растений в порфириновое ядро внедряется магний, и магниевый комплекс через ряд стадий превращается в хлорофилл. У животных образуется железо-протопорфириновый комплекс — гем. Внедрение железа катализируется ферментом «феррохелатазой» (или гем-синтетазой), связанным с митохондриями. По-видимому, винильные группы не играют существенной роли в образовании комплекса с железом, как это считалось раньше, так как фермент внедряет железо и в другие порфирины (гемато-, мезо-, дейтеро-). Ионы других металлов (Mg, Ca, Cu, Pb и др.) ингибируют реакцию.

Нарушения биосинтеза порфиринов. Различные отклонения от нормального течения биосинтеза порфиринов ведут к нарушениям ряда функций организма. Изменение механизма превращения порфобилиногена в уропорфирин является наследственным и приводит к возникновению очень редкого заболевания — врожденной порфирии. Основная масса порфиринов, образующихся в нормальном организме, относится к типу III; порфирины типа I образуются в очень небольшом количестве и легко выводятся из организма. При врожденной порфирии, однако, аутооконденсация порфобилиногена протекает так, что образуется уропорфириноген I, который не может быть далее использован в биосинтезе гема и превращается в уро- и копропорфирины I. Эти порфирины не могут распадаться с образованием желчных пигментов и откладываются в организме (кости и зубы больного пигментированы и флуоресцируют при облучении ультрафиолетовым светом) или экскретируются. Порфирины, циркулирующие в крови, вызывают фотосенсибилизацию кожи, результатом чего являются тяжелые ожоги, и фотосенсибилизированный гемолиз эритроцитов, который стимулирует усиленный синтез гемоглобина и, следовательно, порфиринов типа I, а это еще более отягощает состояние организма.

Блокирование превращения порфобилиногена в уропорфирин вызывает другое тяжелое заболевание — острую порфирию. При этой форме порфирии, включающей нарушения центральной нервной системы, которые сопровождаются параличом или невритами, не наблюдается фотосенсибилизации кожи, так как порфирины образуются в ничтожных количествах; порфобилиноген экскретируется из организма.

Нарушения биосинтеза порфиринов, аналогичные нарушениям при острой порфирии, можно вызвать экспериментально, скормивая подопытным животным аллилизопропилацетамид (седормид). В этом случае наблюдается экскреция δ -аминолевулиновой кислоты и порфобилиногена, возможно, вследствие частичного блокирования путей их дальнейшего превращения.

Нарушение биосинтеза гема на стадии введения железа при действии феррохелатазы также приводит к порфирии.

Причиной наследственных анемий может служить недостаток дегидратазы δ -аминолевулиновой кислоты.

При отравлении некоторыми веществами (снотворными, сульфамидными препаратами, хиноном, производными свинца) или после ряда тяжелых болезней биосинтез порфиринов также нарушается, однако результатом этого является не порфирия, а порфирурия — повышенная экскреция порфиринов с мочой.

Биосинтез глобина. Синтез каждой из полипептидных цепей гемоглобина, по-видимому, мало отличается от биосинтеза других полипептидов. Предполагают, что активированные аминокислоты располагаются в определенном порядке на матрице и соединяются пептидными

ми связями. В принципе, возможен рост полипептидной цепи как с С-, так и с N-конца, или образование отдельных пептидов, которые затем уже соединяются между собой. Исследования по внедрению меченого ^{14}C лейцина в гемоглобин, синтезирующийся *in vivo*, показали, что рост полипептидных цепей Hb протекает от свободного N-конца к свободному С-концу и представляет собой последовательное присоединение аминокислот к растущей цепи со скоростью приблизительно две аминокислоты в секунду.

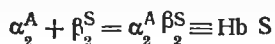
Полагают, что синтезированная линейная полипептидная цепь снимается с матрицы и уже в растворе принимает присущую ей форму (третичная структура).

Генетический контроль над синтезом Hb. Синтез четырех полипептидных цепей Hb человека контролируется четырьмя генами, обозначаемыми по названию цепей: α -, β -, γ - и δ -. Сходство в строении α - и β -, и особенно γ - и β -, β - и δ -цепей наводит на мысль, что все они произошли от общего предшественника в результате большого числа мутаций. Возможно, что на ранних ступенях эволюции существовал гемопротеид только с одной полипептидной цепью, имеющей определенную аминокислотную последовательность, образование которой контролировалось единственным геном. В результате дупликации генетического материала образовался новый ген, развитие которого пошло независимым путем и привело к гену современного миоглобина, имеющего одну полипептидную цепь.

В результате превращений исходного генетического материала образовался современный α -ген, контролирующий синтез α -цепи. На какой-то стадии эволюции от первоначального α -гена к современному вновь произошла дупликация генетического материала, и независимое развитие возникшего гена привело к гену γ -цепи. Наконец, дупликация γ -гена привела к β -гену, а дупликация β -гена — к δ -гену.

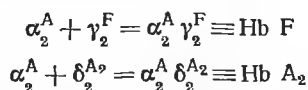
Таким образом, в результате эволюции возникает, например, β -цепь, аминокислотный состав и последовательность аминокислот которой значительно отличаются от α -цепи, но именно это обстоятельство делает β -цепь комплементарной, т. е. дает возможность соединяться с α -цепью. Получающееся при этом соединение — Hb A ($\alpha_2^A \beta_2^A$) — значительно более эффективно переносит кислород, чем гемопротеид с одной полипептидной цепью, например миоглобин. γ - и δ -Цепи также комплементарны по отношению к α -цепи, а образуемые ими соединения Hb F и Hb A₂ — более эффективные переносчики кислорода, чем Hb A.

Нарушения биосинтеза гемоглобина вследствие изменения в генетическом материале. Незначительное изменение генетического материала, например замена нуклеотида или изменение чередования двух нуклеотидов в полинуклеотидной цепи того или другого гена, приводит к замене аминокислоты в полипептидной цепи, синтез которой он контролирует. Так возникают аномальные гемоглобины. По-видимому, некоторые генные локусы особенно чувствительны к таким изменениям. Изменения в одном и том же локусе β -гена, например, приводит к замене в положении 6 β -цепи глутаминовой кислоты валином (Hb S) или лизином (Hb C). Незначительное изменение генетического материала приводит к значительным последствиям для организма. Hb S отличается от Hb A только одной аминокислотой, но он очень плохо растворим в воде при малых давлениях кислорода. Вследствие этого он образует кристаллоидные структуры (тактоиды), которые сильно искажают мембрану эритроцитов. Эритроциты, содержащие Hb S, при малых давлениях кислорода часто имеют вид серпов, поэтому болезнь, возникающая вследствие замены гемоглобина A гемоглобином S, получила название серповидноклеточной анемии. Для возникновения болезни необходимо, чтобы лицо было гомозиготным по гену Hb S, т. е. оба β -гена были генами β^S . Организм вырабатывает при этом α -цепи и β^S -цепи:



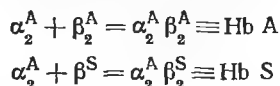
Эритроциты, имеющие искаженную форму при малых давлениях кислорода, очень хрупки и быстро разрушаются. В результате повышенной скорости гемолиза (распада эритроцитов) образуются тромбы, а также местные и общие нарушения кровообращения, ведущие к смертельному исходу.

Однако кроме α - и β^S -генов у организма имеются также γ - и δ -гены, при участии которых синтезируются гемоглобины F и A₂:



Хотя Hb A₂, возможно, и имеется в крови больных серповидноклеточной анемией, но из-за малого содержания (2,5%) он не был бы способен сколько-нибудь значительно увеличивать количество переносимого кровью кислорода. Зато при стимуле хронического недостатка кислорода, возникающего в результате анемии, мобилизуется γ -ген, который обеспечивает увеличенный синтез γ -цепей. При серповидноклеточной анемии Hb F может составлять до 40% общего гемоглобина, а Hb A вообще не встречается, так как при этом вырабатываются только цепи β^S , но не β^A .

У людей, которые гетерозиготны по гену β^S , т. е. имеют гены β^A и β^S , болезнь не наблюдается, хотя и имеются субклинические явления (серповидная форма некоторого числа эритроцитов):



В этом случае вырабатываются как Hb S, количество которого достигает иногда 45%, так и Hb A; кроме того, имеется, конечно, Hb F. Количество нормального гемоглобина достаточно для того, чтобы обеспечить эффективный перенос кислорода, и тяжелых явлений не возникает.

Аналогичные анемии возникают в случае гомозиготности по гену β^C и другим генам аномальных гемоглобинов. В этих случаях не наблюдается серповидноклеточности, однако все аномальные гемоглобины распадаются в организме быстрее, чем Hb A, а синтезируются медленнее, в результате чего организм постоянно страдает от недостатка кислорода. При гетерозиготности по генам этих аномальных гемоглобинов болезнь также не возникает, хотя и имеются субклинические явления.

Еще одним видом врожденной анемии, определяемой неправильностью в синтезе Hb, является талассемия (средиземноморская анемия или анемия Кули). При этой болезни гемоглобин электрофоретически неотличим от Hb A, но его синтез очень затруднен. Анемия возникает при гомозиготности по гену Th. Гемоглобин A(Th) или совсем не вырабатывается, или вырабатывается в небольших количествах. Количество Hb F колеблется от 12 до 100%. Эритроциты имеют мишеневидную форму и быстро распадаются.

Разные аномальные гемоглобины могут встречаться у одного и того же человека. Так, в организме, имеющем β^S - и β^C -гены, вырабатываются Hb S и Hb C, а в случае сочетания генов β^S и A(Th) возникает талассемия.

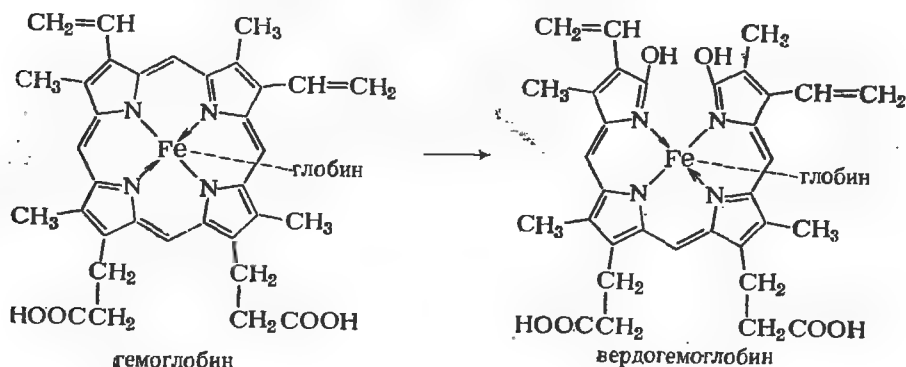
Те же самые незначительные нарушения в молекуле гемоглобина, которые приводят к появлению аномальных гемоглобинов и возникновению тяжелых форм анемии, оказываются жизненно ценными в малярийных районах, так как обеспечивают противомаларийный иммунитет. Ферментный аппарат паразита — плазмодия, проникающего в эритроцит, высокоспециализирован и способен расщеплять полипептиды с определенной аминокислотной последовательностью. Молекула аномального гемоглобина, имеющая только одно незначительное изменение, соединяется с ферментом, но не может быть расщеплена им, выступая, таким образом, в роли ингибитора данного фермента. Гетерозиготные по гену аномального Hb лица менее подвержены заболеванию малярией.

Нарушения биосинтеза, вызванные недостатком некоторых веществ. Биосинтез гемоглобина может нарушаться не только в тех случаях, когда имеются какие-то «неправильности» в структуре генетического материала, но и при недостатке некоторых веществ, необходимых для его синтеза. В случае недостатка железа в пище или при потерях крови, включающих и потерю железа, развивается микроцитарная анемия, характеризующаяся малыми размерами эритроцитов и понижением содержания в них Hb. Железо необходимо на двух этапах синтеза порфиринов: при конденсации глицина и сукцинил-кофермента A с образованием δ -аминолевулиновой кислоты и при внедрении железа в протопорфирин IX, поэтому отсутствие его блокирует синтез сразу в двух местах. Этот недостаток легко восполняется приемом внутрь соли двухвалентного железа, обычно в виде карбоната.

Другое нарушение биосинтеза возникает в случае недостатка витамина В₁₂ (цианкобаламина), возникающего из-за отсутствия в слизистой желудка большого так называемого внутреннего фактора, способствующего всасыванию витамина. В результате этого дефекта развивается тяжелая макроцитарная анемия, при которой эритроциты увеличены в размерах, но содержат недостаточное количество Нв. Эритроциты попадают в кровь незрелыми, так как для их созревания необходим витамин В₁₂; недостаток его, вероятно, блокирует синтез глобина, так как витамин В₁₂ участвует в синтезе белка. Аналогичное нарушение биосинтеза, приводящее к макроцитарной анемии, наблюдается при недостатке фолиевой кислоты.

Катаболизм гемоглобина. Средняя продолжительность жизни эритроцитов составляет примерно 120 дней. После этого они разрушаются клетками ретикулоэндотелиальной системы. Молекулы гемоглобина также распадаются; в результате распада протетической группы — гема — возникают желчные пигменты [64—66], которые выводятся с желчью в кишечник, а железо и аминокислоты остаются в организме.

Первая фаза распада гемоглобина происходит еще в то время, когда гем связан с глобином. α -Метеновый мостик в молекуле протопорфирина окисляется и возникает окрашенный в зеленый цвет железный комплекс биливердинглобина, называемый также вердогемоглобином:



Следующей ступенью является удаление железа из вердогемоглобина. Связь биливердина с глобином при этом сохраняется, но только за счет адсорбционных сил. Вердогемоглобин легко восстанавливается под действием лактатдегидрогеназы и ряда других дегидрогеназных систем, действующих на промежуточные соединения углеводного обмена. При этом средняя метеновая группа биливердина, являвшаяся ранее γ -мостиком в протопорфирине, восстанавливается в метиленовую, и образуется билирубинглобин. Биливердин, не связанный с глобином, не восстанавливается в подобных условиях. Билирубинглобиновый комплекс распадается в клетках печени на глобин и билирубин, который может далее восстанавливаться в мезобилирубин и мезобилиноген, а также поступать в кишечник в виде комплекса с глюкуроновой кислотой. В кишечнике билирубин также восстанавливается в мезобилиноген. Из последнего получают уробилин и стеркобилиноген, дающий затем стеркобилин (см. схему на стр. 149).

Окислительное расщепление гема с образованием желчных пигментов является общим и для других гемопротеидов [67].

Все природные желчные пигменты формально можно получить в результате частичного или полного восстановления биливердина. Они относятся к α -ряду IX, так как возникают при окислительном отщеплении α -углеродного мостика молекулы протопорфирина IX и имеют относи-

тельное расположение заместителей такое же, как в биливердине. Винильные группы могут восстанавливаться в этильные; в этом случае возникают соединения *мезо*-типа.

ЦИТОХРОМЫ

Гемоглобин переносит молекулярный кислород из легких к клеткам тканей, где в результате окисления питательных веществ выделяется энергия, необходимая для жизнедеятельности организма. Однако эти вещества не окисляются непосредственно молекулярным кислородом; перенос электронов с субстрата на кислород осуществляется ступенчато, при помощи ряда переносчиков. Вместо одной реакции окисления с большой энергией активации получается цепь последовательных реакций окисления — восстановления с малыми энергиями активации. Такой механизм позволяет наиболее полно и эффективно использовать энергию, выделяющуюся при окислении питательных веществ. Переносчиками электронов в клетке служат пиридиннуклеотиды, флавопротеиды, хиноны, витамины Е и К и цитохромы; все они легко и обратимо окисляются и восстанавливаются.

Цитохромы были обнаружены еще в 1886 г. при спектральном исследовании тканей животных Мак-Мунном, однако интенсивное изучение их началось только с 1925 г., когда они были вновь открыты Кейлином. Им было установлено, что в клетках присутствуют три типа цитохромов — *a*, *b* и *c*, имеющих следующие полосы поглощения:

Цитохромы	Полосы поглощения, нм		
	α	β	γ
<i>a</i>	604	532	448—449
<i>b</i>	566	528	428—432
<i>c</i>	550	521	415—417

Эти полосы четко выражены у восстановленных форм цитохромов, содержащих Fe^{2+} ; у цитохромов *a* β -полоса выражена слабо, а иногда вообще отсутствует. При окислении цитохромов α - и β -полосы исчезают, а γ -полоса смещается в коротковолновую часть спектра. Это очень важно для изучения процессов окисления — восстановления в самой клетке. Цитохромы гораздо труднее выделить из тканей в индивидуальном состоянии, чем другие гемопротеиды. Кроме того, многие цитохромы связаны с клеточными структурами, и чтобы правильно понять их функцию, необходимо проводить исследования, не разрушая эти связи. Поэтому спектральные методы при изучении цитохромов имеют исключительно важное значение; многие цитохромы охарактеризованы только спектроскопически.

К другому типу методов исследования цитохромов относятся методы, основанные на измерении их каталитической активности, отравлении их различными ингибиторами (цианид, окись углерода и т. д.).

Кроме первоначально известных цитохромов *a*, *b* и *c* был открыт ряд других цитохромов, которые относили в ту или иную группу в основном по их спектральным характеристикам; порядковый номер (*a*₄, *b*₂, *c*₁) давался этим цитохромам в зависимости от порядка их открытия после цитохромов *a*, *b* и *c*. Такой метод был очень условным и мог привести к путанице. Некоторые цитохромы, обнаруженные в последние годы, не могли быть отнесены ни в одну из этих групп. В связи с этим Комиссией по ферментам Международного биохимического союза была

разработана новая номенклатура цитохромов, согласно которой все исследованные до настоящего времени цитохромы относятся к одной из четырех групп [68].

В группу *A* входят цитохромы, имеющие в качестве простетической группы железо-формилпорфирин (гем *a* или родственный ему гем с формильной боковой цепью).

К группе *B* относятся цитохромы, имеющие в качестве простетической группы протогем IX (как у гемоглобинов и миоглобинов).

Группа *C* включает цитохромы с замещенным мезогемом IX в качестве простетической группы, причем гем связан с белком ковалентными тиоэфирными связями.

Цитохромы группы *D* содержат в качестве простетической группы не железо-порфирин, как соединения трех предшествующих групп, а железодигидропорфирин (железо-хлорин).

Практическими критериями для отнесения цитохрома в одну из этих четырех групп служат положения α -полосы пиридин-феррогемохрома, приготовленного из гемопротеида в щелочном растворе, и растворимость в эфире гемина, полученного путем обработки цитохрома смесью ацетона и соляной кислоты:

Группа	α -Полоса пиридин-феррогемохрома в щелочном растворе, нм	Растворимость в эфире продукта обработки цитохрома ацетоном и HCl
<i>A</i>	580—590	Растворим
<i>B</i>	556—558	Растворим
<i>C</i>	549—551	Нерастворим
<i>D</i>	600—620	Растворим

Для определения природы простетической группы и, таким образом, групповой принадлежности цитохрома можно использовать также химические превращения, которые сопровождаются обычно характерными спектральными изменениями. Образование оксима при реакции гемина с гидроксиламином свидетельствует о наличии в порфириновом ядре формильной группы, что позволяет отнести соединение в группу *A*. Восстановление ненасыщенных боковых цепей (например, гидрированием над платиной) указывает на присутствие протогема (группа *B*). Характерной реакцией цитохромов группы *C* является расщепление тиоэфирной связи сульфатом серебра. Наконец, для соединений группы *D* характерно наличие специфической полосы при 605 нм в спектре поглощения раствора гемина в уксусной кислоте и образование соответствующего хлорина.

В настоящее время известно свыше тридцати цитохромов. В литературе можно встретить названия нескольких различных типов, которые соответствуют различным уровням накопленных сведений о данном соединении. Так, название типа «цитохром 554 (*Chlorobium*)» является предварительным и означает, что об этом соединении в данное время известны следующие основные сведения: оно является гемопротеидом из водоросли *Chlorobium*, в спектре восстановленной формы имеется α -полоса при 554 нм; изучение его внутриклеточного окисления — восстановления показало, что оно является цитохромом. Название типа «цитохром *c* (554, *Chlorobium*)» также является временным и показывает, что вещество уже получено в достаточно очищенном виде и на основании критериев принадлежности к той или иной группе отнесено к группе *C*. Наконец, название типа «цитохром *b₅*» является окончательным и означает, что принадлежность цитохрома к группе *B* установлена точно при помощи реакций, определяющих природу простетической группы, причем показано, что вещество является индивидуальным.

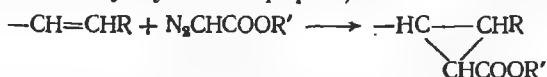
Необходимо, однако, иметь в виду, что эти рациональные принципы номенклатуры были разработаны относительно недавно; и в литературе до 1962 г., и в некоторых бо-

...ее поздних работах можно встретить названия другого типа (цитохромы *f*, *h*, *RHP* и т. д.).

Цитохромы, известные в настоящее время, включены в «Список цитохромов», составленный Комиссией по ферментам [68], причем список этот пополняется по мере выделения новых соединений.

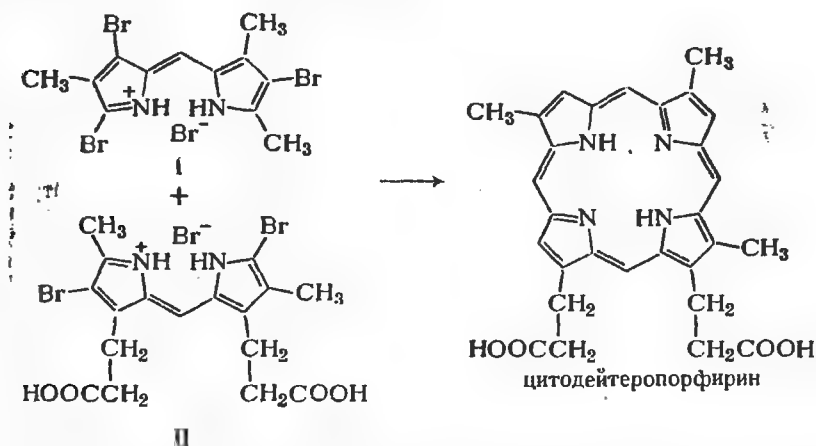
ЦИТОХРОМЫ ГРУППЫ А

Простетической группой цитохромов *a* служит цитогемин, или гемин *a*, из которого удалением железа получают порфирин *a*. Одним из заместителей в порфириновом кольце является формильная группа, присутствие которой доказывается получением оксима, гидразона, диметилацетала, продукта присоединения бисульфита. Наличие винильной (или алкилвинильной) группы было доказано каталитическим гидрированием и присоединением диазоуксусного эфира к порфируну *a* в том случае, когда формильная группа защищена оксимированием (формильная группа также реагирует с диазоуксусным эфиром):



Присутствие в порфирине *a* α -оксисалкильной группы показано окислением ее в α -кетоалкильную группу, дегидратацией в алкилвинильную группу и повышением значения R_f при ацетилировании [69].

При сплавлении порфирина *a* с резорцином (190°C) формильная, оксисалкильная и алкилвинильная группы отщепляются и возникает цитодейтеропорфирин, отличающийся от дейтеропорфирина IX тем, что он содержит на одну метильную группу меньше и имеет три незамещенных β -положения порфиринового ядра: при бромировании его получается трибромпроизводное, в то время как при бромировании дейтеропорфирина — дибромпроизводное. Строение цитодейтеропорфирина было подтверждено синтезом. Сплавление дипиррилметенов I и II в метилиантарной кислоте дало продукт, идентичный природному, в то время как изомерные соединения от него отличались:



После установления строения цитодейтеропорфирина нужно было определить положения заместителей в порфирине *a*, удаляемых при сплавлении с резорцином. Формильная группа была превращена в ок-

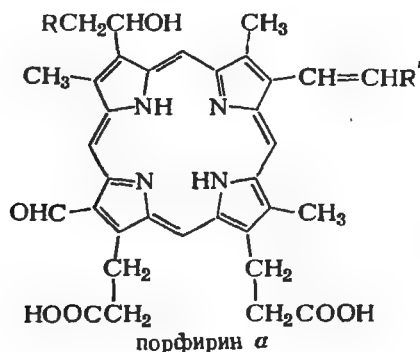
симную, а затем в нитрильную дегидратацией уксусным ангидридом. При окислении полученного нитрила перманганатом калия образуются производные пиррола, содержащие карбоксильные группы в α, α' -положениях, CN-группа при этом не изменяется. Таким образом, при окислении цианопорфирина могло получиться одно из двух приведенных ниже пиррольных производных в зависимости от того, находится ли формильная группа в пиррольном кольце I, II или IV:



При хроматографическом анализе продуктов окисления цианопорфирина перманганатом было обнаружено, однако, только соединение, содержащее карбоксиэтильную группировку, которое могло возникнуть лишь в том случае, если формильная группа была в кольце IV. Таким образом, было установлено, что формильная группа находится в положении 8 порфиринового ядра.

Относительное расположение двух других заместителей определили на основании спектральных данных. Порфирин *a* имеет *оксо-родо*-тип спектра, т. е. формильная и алкилвинильная группы находятся у противоположных пиррольных ядер. Поскольку формильная группа находится в положении 8, следовательно алкилвинильная группа — в положении 4, а α -оксиалкильная — в положении 2.

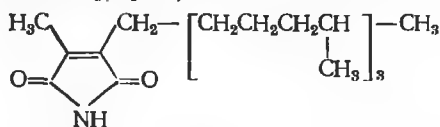
На основании полученных данных строение порфирина *a* можно изобразить следующим образом [70]:



Дальнейшие данные о структуре порфирина *a* были получены в результате изучения продуктов окислительной деградации восстановленного порфирина *a*.

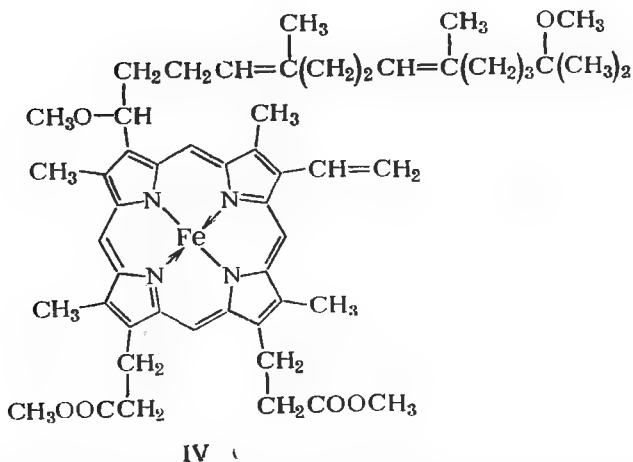
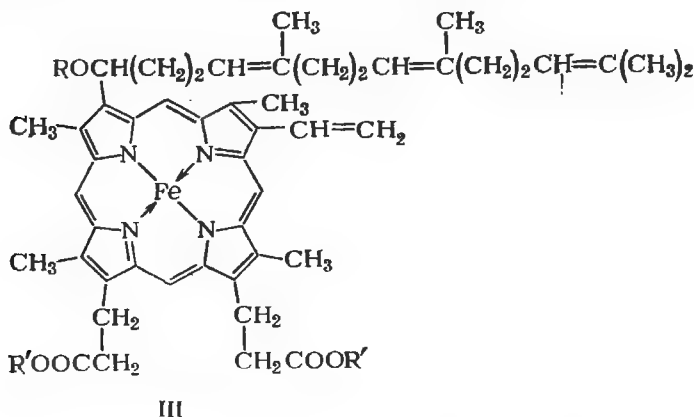
Порфирин *a* был прогидрирован в присутствии палладия в муравьиной кислоте; при этом восстанавливались двойные связи в боковой цепи, формильная и α -оксиалкильная группы. Из продуктов окисления гидрированного порфирина *a*, не содержащего лабильных, легко окисляющихся групп, хромовой кислотой были выделены метилэтилмалеинимид, имид гематиновой кислоты и липофильный метилалкилмалеинимид, который был идентичен с синтетическим метил-(5,9,13-триметил-

тетрадецил)-малеинимидом (ИК- и масс-спектры, тонкослойная и газо-жидкостная хроматография)



Выделение из продуктов окисления метилэтилмалеинимида показывает, что у порфирина *a* в положении 4 стоит незамещенная винильная группа ($\text{R}'=\text{H}$). Из структуры приведенного выше липофильного метилалкилмалеинимида становится ясным углеродный скелет алкильного заместителя (R) в порфирине *a*.

Дополнительную информацию о строении липофильного заместителя в положении 2 дают ПМР-спектры продуктов реакции гема *a* III ($\text{R}=\text{H}$) со спиртами. При взаимодействии с этиловым спиртом в присутствии серной кислоты получается соединение III ($\text{R}=\text{C}_2\text{H}_5$), с метиловым спиртом в тех же условиях — соединение IV:



Сравнение ПМР-спектров гема *a* и продукта его взаимодействия с этиловым спиртом показывает, что оба соединения содержат в положении 2 *транс,транс*-фарнезилную группу с кислородной функцией

у C_1 . Используемые в ранних работах методы выделения порфирина a не позволяли сохранить лабильный заместитель R , и во всех препаратах порфирина a обнаруживали свободную гидроксильную группу. В настоящее время существуют методы, позволяющие выделить нативный гем a , однако природа заместителя R пока не установлена. Возможно, что он является аминсахаром.

Если действительно имеются два различных гема a , один из которых входит в цитохром a , а другой в цитохром a_3 , то они должны отличаться заместителем R . Следует отметить, что различия цитохромов a и a_3 могут быть обусловлены различным характером связи одного и того же гема a с белком.

Длинная боковая цепь в положении 2 порфирина a , по-видимому, играет важную роль в переносе электронов в дыхательной цепи и в сопряженном с ней процессе фосфорилирования.

Цитохромоксидаза. Конечным ферментом дыхательной цепи, окисляющим цитохром c и передающим электроны молекулярному кислороду, является цитохромоксидаза, которая в настоящее время рассматривается как комплекс цитохромов a и a_3 .

Структура и функции цитохромоксидазы окончательно не выяснены. Молекулярная масса этого фермента $\sim 240\,000$. Предполагают, что он состоит из шести субъединиц, каждая из которых содержит один гем a и один атом меди (обнаружена с помощью спектров ЭПР). Две субъединицы по спектру поглощения относят к цитохрому a , четыре — к цитохрому a_3 . С кислородом может взаимодействовать только цитохром a_3 , цитохром a не имеет такой способности. Перенос электронов на кислород сопровождается превращением $Cu(II)$ в $Cu(I)$. Цитохромоксидаза, таким образом, является «многоглавым» ферментом, содержащим различные простетические группы — атом меди и гем a .

ЦИТОХРОМЫ ГРУППЫ B

Цитохромы группы B содержат в качестве простетической группы протогем IX.

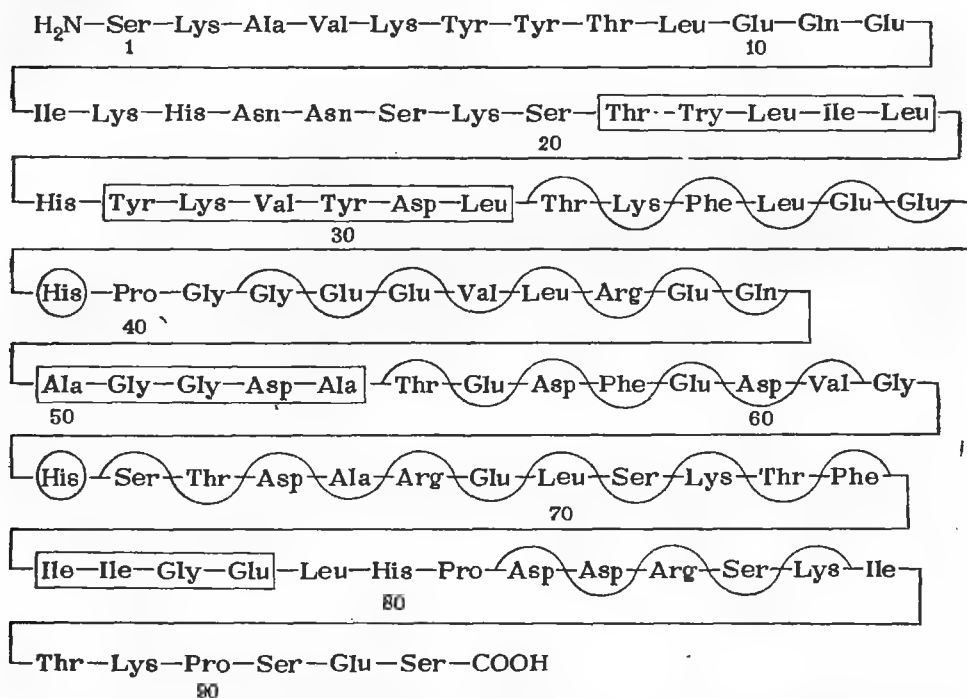
Цитохром b ассоциирован с липопротеиновой мембраной митохондрий и, возможно, сам является липопротеином. Относительно роли этого гемопротеида в животных тканях существуют различные мнения, однако можно предположить, что он находится на главном пути окисления сукцината. Антимицин, ингибирующий окисление сукцината, вероятно, реагирует непосредственно с цитохромом b . Аналогичные соединения, цитохромы b_1 , были выделены из некоторых бактерий.

Одним из наиболее хорошо изученных цитохромов группы B является цитохром b_2 . Кристаллическое вещество содержит дезоксирибонуклеотидную компоненту; молекулярная масса его равна $160\,000$. После отделения полинуклеотида получается соединение с молекулярной массой $150\,000$, которое уже не кристаллизуется, но обладает полной ферментативной активностью. Цитохром b_2 был первым из открытых «многоглавых» ферментов. В качестве простетических групп он содержит протогем IX (одна группа гема приходится на единицу с молекулярной массой $80\,000$) и рибофлавин-5-фосфат в эквимольных соотношениях. Возможно, что кристаллическое вещество является димером. Цитохром b_2 был идентифицирован с лактатдегидрогеназой дрожжей, осуществляющей окисление молочной кислоты в пировиноградную. При этом

атомы водорода (или электроны) передаются от субстрата прямо к флавинмоноклеотиду, а затем к гемину.

Цитохром b_5 выделен из микросом ткани печени. Под действием специфического фермента цитохром- b_5 -редуктазы происходит перенос электронов от восстановленного НАД к железу цитохрома b_5 . Цитохром b_5 участвует в реакциях дегидрирования жирных кислот в микросомах, а в эритроцитах — в реакции восстановления метгемоглобина.

Цитохром b_5 является единственным цитохромом, кроме цитохрома c , для которого была установлена полная аминокислотная последовательность. Наиболее детально изучен цитохром b_5 из печени телят, для которого определена аминокислотная последовательность, а также вторичная и третичная структуры [71]. Этот цитохром имеет молекулярную массу порядка 11 000 и состоит из 93 аминокислот:



Рентгеноструктурный анализ этого гемопротенда показал, что полипептидная цепь содержит пять коротких спиральных участков, включающих следующие аминокислотные остатки: 33—38, 42—49, 55—61, 64—74 и 82—86. Четыре коротких сегмента цепи, включающих остатки 21—25, 27—32, 50—54 и 75—78, образуют складчатую структуру. Эти элементы вторичной структуры включают 60% аминокислотных остатков. В целом полипептидная цепь уложена в клубок, имеющий форму эллипсоида с размерами $2,5 \times 2,5 \times 3,2$ нм.

Внутренняя часть молекулы образована неполярными остатками. Боковые цепи глутаминовой и аспарагиновой кислот, лизина, аргинина, серина, треонина, глутамина и аспарагина лежат на поверхности молекулы, как и у многих других белков с известной структурой.

Участок полипептидной цепи, включающий аминокислотные остатки 21—78, образует щель, в которую уложена группа гема (рис. 16). Стен-

ки этой щели образованы двумя парами приблизительно антипараллельных спиральных сегментов, а дно — складчатой структурой. Остатки гистидина 39 и 63 расположены в неспиральных участках в вершине щели между каждой парой спиралей и направлены к центру щели, образуя связь с железом гема. Группа гема плотно входит в гидрофобную часть щели; ее винильные группы находятся в глубине молекулы, а остатки пропионовой кислоты — у поверхности, причем одна группа — в связанном состоянии, а другая контактирует с раствором. Связанные с гемом остатки гистидина (39 и 63) прочно фиксированы в третичной

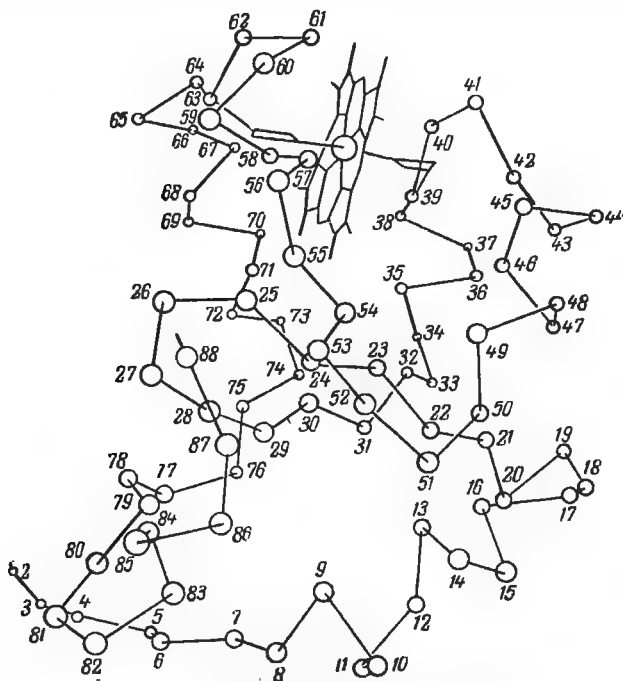


Рис. 16. Схема расположения полипептидной цепи и группы гема в молекуле цитохрома b_5 .

структуре благодаря ряду межмолекулярных взаимодействий и не могут быть замещены другими лигандами без нарушения структуры белка. Такая структура исключает возможность переноса электронов от небольшой молекулы путем ее непосредственного взаимодействия с железом гема.

Интересно сравнить структуру цитохрома b_5 со структурой других гемопroteидов — миоглобина, гемоглобина и цитохрома c . Аминокислотные последовательности полипептидной цепи цитохрома b_5 , миоглобина и α - и β -цепей глобина очень близки. Однако способность к связыванию лигандов и физиологические функции этих гемопroteидов совершенно различны, что обусловлено различием их вторичной и третичной структур.

Цитохромы b_5 и c выполняют в организме сходные функции, однако аминокислотные последовательности их полипептидных цепей и пространственные структуры совершенно различны. В молекуле цитохрома c относительно мало спиральных и складчатых участков; полипептид-

ная цепь расположена вокруг группы гема, образуя оболочку толщиной в одну полипептидную цепь [72]. Один из остатков пропионовой кислоты гема, присоединенного к белку ковалентными связями, находится в глубине молекулы, образуя водородные связи с остатками аминокислот. В цитохроме b_5 атом железа координационно связан с шестью почти эквивалентными атомами азота; в цитохроме c и миоглобине координация лигандов несимметрична, шестым лигандом служат соответственно метионин или вода. Общим для молекул этих гемопротендов является гидрофобное окружение групп гема.

Для структуры цитохрома b_5 характерно распределение кислых (глутаминовая и аспарагиновая кислоты) и основных (лизин и аргинин) аминокислотных остатков на поверхности молекулы. Участок полипептидной цепи вокруг группы гема (остатки 21—78) содержит 5 из 12 основных и 14 из 20 кислотных остатков и, таким образом, оказывается очень кислым. Именно эта часть молекулы может определять взаимодействие цитохрома b_5 с соответствующей редуктазой и оксидазой в процессе переноса электронов, как и в случае цитохрома c .

ЦИТОХРОМЫ ГРУППЫ C

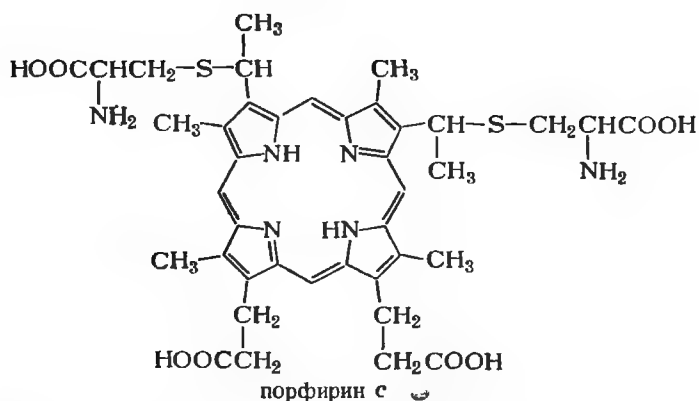
К группе C относят цитохромы, имеющие в качестве простетической группы замещенный мезогем IX, связанный с белковой частью молекулы тиоэфирными связями.

Главная функция цитохромов c , как и вообще всех цитохромов, связана с их участием в окислительной цепи в роли переносчиков электронов (водорода).

Цитохром c изучен лучше всех цитохромов. Для получения чистого цитохрома c используют экстракцию и осаждение различными реагентами, в частности метод солевой экстракции, а также различную адсорбируемость восстановленной и окисленной форм; окисленное вещество легко адсорбируется на каолине, а при его восстановлении происходит десорбция. Высокая степень очистки достигается хроматографией. Хроматографически чистые препараты, так же как кристаллические соединения, содержат 0,45% железа, что соответствует молекулярной массе 13 000.

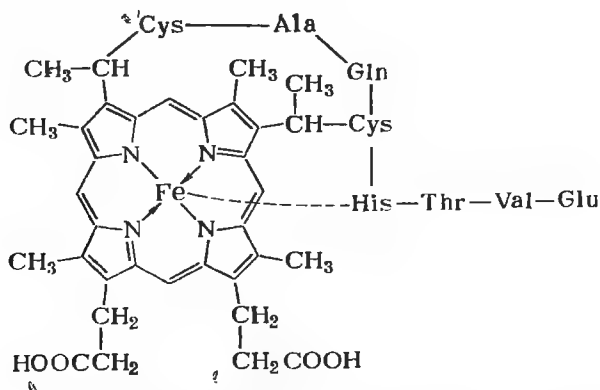
Очищенный цитохром c не разрушается, не теряет каталитических свойств при действии на него разбавленных кислот или щелочей в пределах pH 4—11,5, не изменяется при кипячении. В нейтральной среде восстановленный цитохром c не окисляется молекулярным кислородом, но окисляется перекисью водорода, феррицианидом и солями меди. Окисленный цитохром c восстанавливается такими восстановителями, как гидросульфит, цистеин, полифенолы и аскорбиновая кислота, а также цитохромами b_5 и c_1 и рядом ферментов.

При гидролизе цитохрома c получается порфирин c . При действии на порфирин бромистоводородной кислоты в уксусной кислоте возникает гематопорфирин, который может быть превращен в мезопорфирин IX. Боковые цепи в порфирине c расположены так же, как в протопорфирине IX, но он не содержит винильных групп: положение полос в спектре поглощения его гемохрома напоминает скорее положение полос мезогемохромов, т. е. вместо винильных групп он содержит этильные:



При обработке порфирина бромистоводородной кислотой удаляются две молекулы цистеина и возникает гематопорфирин; следовательно, два остатка цистеина были присоединены тиоэфирными связями к α -углеродным атомам этильных групп мезопорфирина. Порфирин с легко получается при реакции цистеина с протопорфирином IX путем присоединения сульфгидрильных групп к винильным.

Два остатка цистеина, находящиеся в молекуле порфирина с, представляют собой часть полипептидной цепи цитохрома. После частичного расщепления цитохрома с протеолитическими ферментами выделены пептиды, присоединенные к гему (гемопептиды), и определена аминокислотная последовательность этих пептидов у цитохромов, выделенных из различных видов организмов. Гемопептид цитохрома с из сердечной мышцы быка представлен ниже:



Связь гема с остатками цистеина подтверждена получением ряда синтетических гемопептидов. У всех видов остатки цистеина в пептиде разделены двумя другими аминокислотными остатками, у каждого имеется последовательность His—Thr рядом с одним остатком цистеина и основной остаток — лизин или аргинин — рядом со вторым остатком цистеина (см. стр. 161). Вероятно, это обусловлено определенными пространственными требованиями, осуществление которых связано с ферментативной активностью цитохрома с. Нарушение этих требований приводит к потере ферментативной активности.

Гем присоединен к белку ковалентными тиоэфирными связями и координационными связями между атомами железа и азота. Тиоэфирные

связи настолько прочны, что можно, не разрывая их, удалить железо из гема, а связи между атомами железа и азота легко разрываются при рН ниже 3 и выше 11. Связи железа с негемным азотом обуславливают гемохромный тип спектра цитохрома *c* и тот факт, что цитохром *c* не реагирует с окисью углерода. Одна из связей Fe—N образуется за счет азота имидазола гистидина: это доказывается тем, что при сочетании цитохрома с *n*-диазобензолсульфокислотой исчезает способность к обратимому окислению — восстановлению и изменяется характер спектра.

Конформация нативного цитохрома *c* определяет его ферментативную активность. Чем больше денатурирован гемопротейд, т. е. чем больше изменена конформация нативного белка, тем ниже его ферментативная активность, выше способность к аутоокислению и соединению с окисью углерода; окислительно-восстановительный потенциал также изменяется при изменении конформации. К потере ферментативной активности приводит и исчерпывающее ацетилирование, что показывает значение свободных аминогрупп для проявления каталитических свойств гемопротейда. Подобный же эффект оказывает иодирование цитохрома (роль оксифенильных групп тирозина).

Важнейшее значение для понимания взаимосвязи между структурой и функциями цитохрома *c* имеет точное знание его белковой структуры.

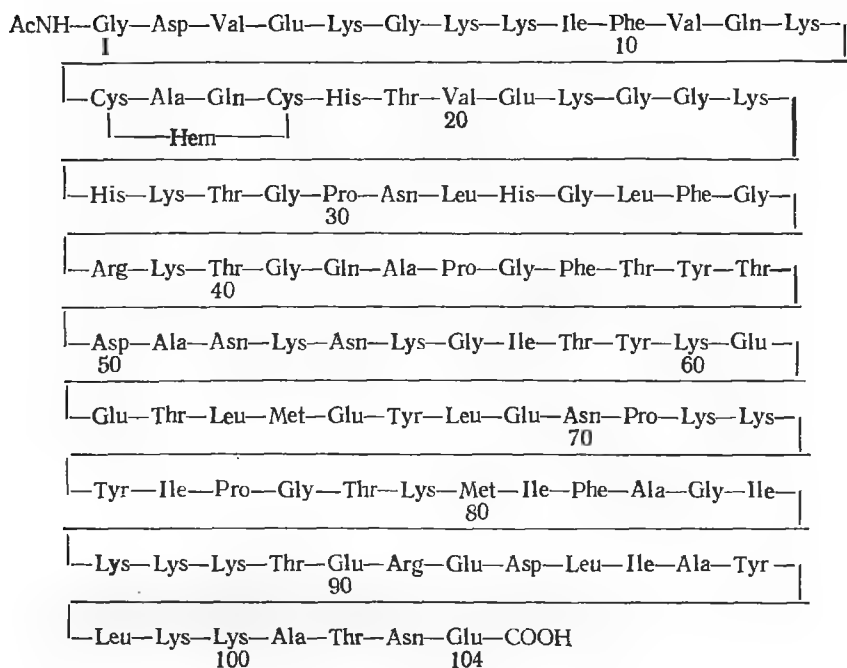
Цитохром *c* из сердечной мышцы лошади был первым цитохромом, для которого установили полную аминокислотную последовательность. Гидролиз цитохрома *c* химотрипсином дал тринадцать больших пептидов, которые были разделены хроматографией на ионообменных смолах и очищены далее при помощи электрофореза и хроматографии на бумаге. Аминокислотная последовательность пептидов была установлена при помощи химических и ферментативных методов. Химические методы включали динитрофенилирование по Сэнджеру и деградацию по Эдману для идентификации N-концевых аминокислот, ферментативные — гидролиз лейцинаминопептидазой для определения N-концевых и карбоксипептидазой А для определения С-концевых аминокислот; оба фермента использовались также для определения коротких аминокислотных последовательностей.

Длинные химотриптические пептиды гидролизовали также при помощи эндопептидаз — трипсина и папаина. Полученные при этом более короткие пептиды выделяли и очищали; их аминокислотные последовательности определяли при помощи описанных выше методов. Таким образом была установлена аминокислотная последовательность всех тринадцати химотриптических пептидов.

Гидролиз цитохрома *c* трипсином дал двадцать триптических пептидов, выделение, очистка и установление строения которых осуществлялись методами, полностью аналогичными использованным в случае химотриптических пептидов.

Сравнение аминокислотных последовательностей триптических и химотриптических пептидов позволило установить полную аминокислотную последовательность этого цитохрома (см. стр. 161).

Эта последовательность включает 104 аминокислоты; характерным для нее является наличие ацетилированной N-концевой аминогруппы. Можно заметить, что кислые и основные аминокислоты собраны в группы, например остатки 90—93 (кислые) и 84—88 (основные) и др. Крупные гидрофобные остатки (Leu, Ile, Phe, Tyr, Trp) также собраны в группы. Таким образом, в полипептидной цепи имеются участки



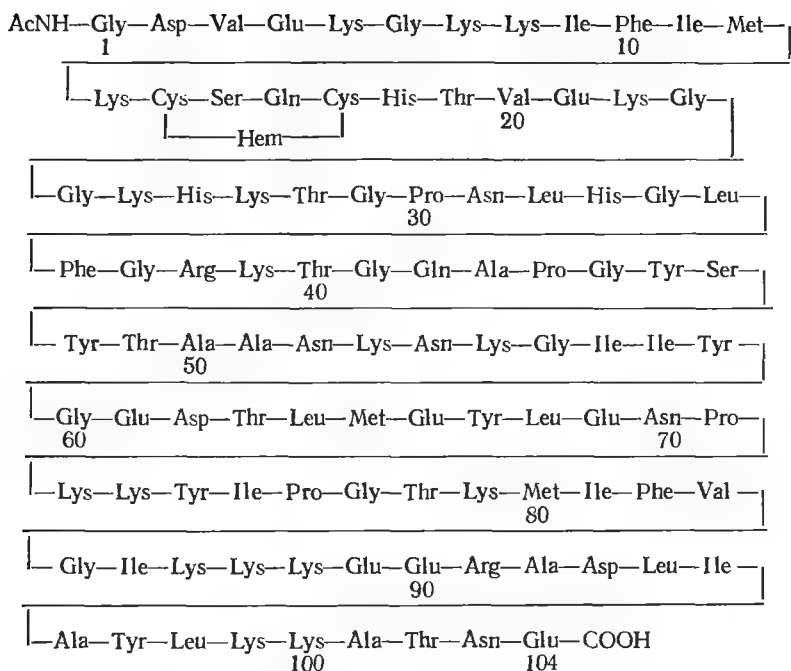
с резко различной полярностью, что, по-видимому, должно определять специфическую третичную структуру цитохрома *c*.

Полипептидная цепь цитохрома *c* сильно отличается от α - и β -цепей гемоглобина и от цепи миоглобина. Гем присоединен тиоэфирными связями к остаткам цистеина в положениях 14 и 17 и находится, таким образом, гораздо ближе к N-концу, чем нековалентно связанный гем в гемоглобине и миоглобине.

Цитохромы *c*, обладающие подобными свойствами и способностью реагировать с соответствующими окислительно-восстановительными ферментными системами, были выделены из различных природных источников: млекопитающих, птиц, рыб и растительных клеток. Все они имеют молекулярную массу порядка 12 000—13 000, окислительно-восстановительный потенциал +0,250 В и являются основными белками.

Уже на ранних этапах исследования строения цитохромов *c* было установлено, что гемопептиды, получающиеся при гидролизе цитохромов *c* из различных видов, обладают сходной структурой.

Установление строения цитохрома *c* из сердца человека показало почти полное подобие его лошадиному гемопротейду. Он также состоит из 104 аминокислот, причем N-концевой глицин ацетилирован; положение и характер присоединения гема к полипептидной цепи, распределение основных и гидрофобных остатков одинаковы в обоих белках; наконец, большие участки полипептидных цепей полностью идентичны. Цитохром *c* человека отличается от цитохрома *c* лошади 12 аминокислотными остатками, причем ряд аминокислот замещен подобными (например, Glu в положении 62 на Asp), а ряд — совершенно отличными аминокислотными остатками (Glu в положении 92 на Ala):



По-видимому, замещения подобными аминокислотными остатками имеют место в участках полипептидной цепи, играющих решающую роль в определении третичной структуры, в то время как совершенно отличные замещения происходят в местах, несущественных для определения конформации белковой молекулы. Для этих белков характерна также различная последовательность аминокислот вблизи гема, между двумя цистеиновыми остатками; это может означать, что для свойств данных гемопротеидов большее значение имеет общая пространственная конфигурация полипептидной цепи в области гема, а не природа отдельных аминокислотных остатков.

Несомненный интерес представляет также сравнение строения белков, выделенных из далеко отстоящих видов, например млекопитающих и пресмыкающихся. Определение структуры цитохрома *c* из сердечной мышцы гремучей змеи показало, что он состоит из 104 аминокислотных остатков, имеет N-концевой ацетилированный глицин, гем, присоединенный к остатку цистеина в положениях 14 и 17, и отличается от белка человека только 14 аминокислотными остатками: 11 из них приходится на 24 остатка с С-конца; это может свидетельствовать о несущественной роли значительного отрезка полипептидной цепи у С-конца в определении функциональных свойств молекулы. Таким образом, даже у столь отдаленных видов, как человек и гремучая змея, структура цитохромов *c* оказывается сходной. В то же время цитохром *c*, выделенный из дрожжей, несколько отличается от цитохромов позвоночных. К остатку глицина, который в белках позвоночных является N-концевым, вместо ацетильной группы у него присоединена дополнительная последовательность из четырех аминокислот; остатки в С-концевой последовательности также отличаются.

ственной структуры цитохрома *c* даст ключ к выяснению механизма действия этого белка в организме.

Рентгеноструктурный анализ при разрешении в 0,4 нм позволил определить основные черты третичной структуры цитрохрома *c* [73]. Метод, примененный для исследования феррицитохрома *c* (окисленной формы цитохрома *c*), выделенного из сердечной мышцы лошади, был

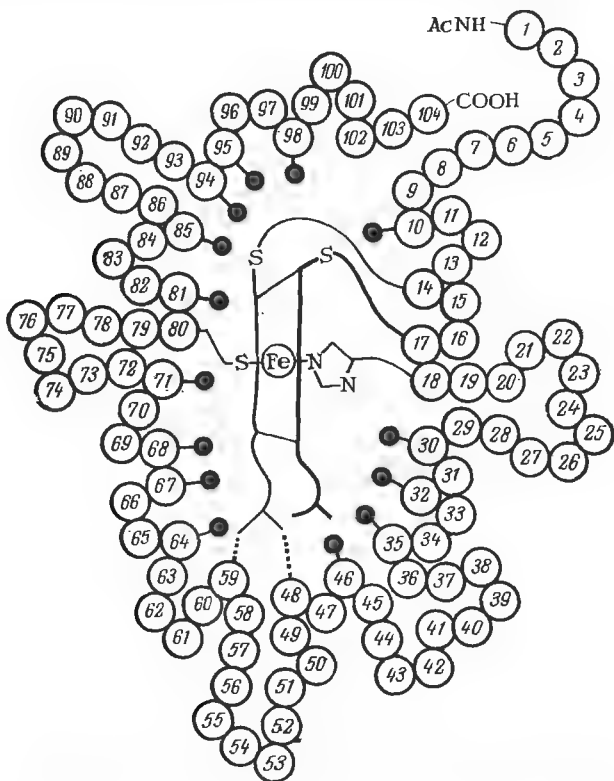


Рис. 17. Схема молекулы феррицитохрома с из сердечной мышцы лошади.

полностью аналогичен методам, использованным Перутцем для установления строения гемоглобина и Кендрю — для миоглобина. Использование изоморфных производных платины и ртути дало возможность построить пространственную модель феррицитохрома с (рис. 17). Молекула представляет собой вытянутый сфероид размером $2,5 \times 2,5 \times 3,7$ нм. На одной стороне ее имеется довольно широкая щель, в которой помещается гем, причем плоскость гема перпендикулярна поверхности молекулы; большая часть гема находится, таким образом, внутри белковой молекулы, и порфирин только с одной стороны доступен для растворителя. Недалеко от вершины щели находятся остатки цистеина (14 и 17), к которым гем присоединен тиоэфирными связями. Боковые цепи пропионовых кислот гема в отличие от молекул гемоглобина и миоглобина не имеют контакта с растворителем, они находятся в кармане внутри белковой молекулы, причем одна группа — ближе к поверхности молекулы, а другая — дальше от нее; вероятно, эти группы ассоциированы с основными боковыми цепями внутри кармана. По обоим сторо-

нам щели расположены лиганды, занимающие 5 и 6 координационные положения железа гема. Одним из них является имидазол остатка гистидина в положении 18, другим — метионин в положении 80.

Центр молекулы феррицитохрома *c* состоит из плотно упакованных гидрофобных боковых цепей. Вокруг этого ядра находится оболочка, образованная полипептидной цепью, которая обвита таким образом, что возникает плотный гладкий слой. Он нарушен только в трех местах: там, где помещается щель с группой гема, и в местах внедрения двух «каналов». Эти «каналы» не являются каналами в обычном смысле слова, т. е. свободным пространством, доступным для молекул растворителя. Они представляют собой плотно упакованные боковые цепи, по-видимому, гидрофильные, которые внедряются в глубь белковой молекулы, не встречая на своем пути оболочки, образованной полипептидной цепью. Один такой «канал» проходит вниз от вершины молекулы параллельно оси, другой уходит внутрь от той стороны поверхности гема, с которой находится имидазольный лиганд. Наконец, снаружи плотной оболочки лежит слой, образованный гидрофильными боковыми цепями, непосредственно взаимодействующими с молекулами воды и электролитов. Таким образом, структура молекулы цитохрома *c* является очень хорошим примером часто предлагаемой для сложных белков модели «гидрофобной капли».

Для полипептидной цепи молекулы цитохрома *c* характерно почти полное отсутствие α -спиральных участков. Только один участок цепи с той стороны гема, с которой расположен лиганд, не являющийся имидазолом (по-видимому, метионин), может содержать от одного до полутора витков α -спирали.

Таким образом, третичная структура цитохрома *c* совершенно отличается от структуры гемоглобина и миоглобина. Это соответствует полному различию специфических биологических функций данных гемопротеидов.

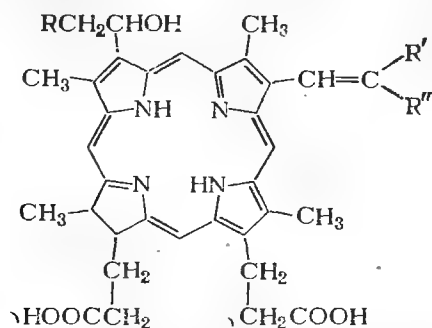
Другие цитохромы группы *C* изучены гораздо меньше, хотя для некоторых из них кроме спектральных данных определены молекулярные массы и окислительно-восстановительные потенциалы.

Наибольший интерес из таких цитохромов представляют бактериальные цитохромы. Различные пурпурные фотосинтетические бактерии содержат два главных вида растворимых цитохромов *c*: цитохромы c_2 , которые напоминают цитохромы *c* млекопитающих, и цитохромы cc' , имеющие две группы гема, ковалентно связанные с одной полипептидной цепью, примерно в два раза большей по размеру, чем цепь цитохромов c_2 . Спектры поглощения и химические свойства цитохромов cc' отличны от спектров и свойств цитохромов *c* млекопитающих. Цитохромы cc' относились ранее к цитохромам типа *RHP* (группа *D* по более старой классификации Мортон). Характерной особенностью цитохромов cc' по сравнению с цитохромами *c* является гораздо большая реакционная способность по отношению к кислороду и окиси углерода, что указывает на иной характер связи гемного железа с азотсодержащими группами белка. Если в цитохроме *c* две координационные связи между атомом железа и донорными атомами (азотом имидазола гистидина и серой метионина) довольно прочны, то в цитохромах типа cc' эти связи или совсем отсутствуют, или очень слабы. Цитохромы типа cc' являются, как правило, дигемопротеидами, однако выделен моногемопротенд, который обладает свойствами, характерными для цитохромов типа cc' .

ЦИТОХРОМЫ ГРУППЫ D

Эта группа включает цитохром *d* (старое название цитохром *a*₂) и цитохром *d*₁ (*a*₄).

Цитохром *d* (полосы поглощения 630, 552 и 518 нм) выполняет роль конечной оксидазы у *Aerobacter aerogenes* и аэробных культур некоторых других бактерий. Простетической группой его является гем *a*₂. При действии разбавленных растворов соляной кислоты железо удаляется и образуется хлорин *a*₂ (полосы поглощения при 653, 598, 534, 503, 405 нм). Каталитическое гидрирование с последующим окислением дает порфирин, похожий по свойствам на мезопорфирин. При восстановлении нодистоводородной кислотой получается порфирин, подобный 2-оксиэтил-4-этилдейтеропорфиру. Наличие гидроксильной группы показано также бумажной хроматографией: *R_f* при хроматографии в системе керосин — пропанол ниже, чем у аналогичного хлорина, не имеющего гидроксильной группы (мезохлорин), и возрастает при ацетилировании. Присоединение диазоуксусного эфира показывает наличие винильной группы. На основании сравнения хлорина *a*₂ с другими порфиринами была предложена его формула (R или R' и R'' скорее всего представляют собой не атомы водорода, а алкильные боковые цепи, учитывая липофильные свойства хлорина *a*₂; дополнительные водородные атомы помещены в кольцо IV по аналогии с хлорофиллами):



Цитохромоксидаза из *Pseudomonas aeruginosa* имеет две простетические группы — гем *a*₂ и замещенный мезогем, присоединенный ковалентными тиозфирными связями к полипептидной цепи. Этот цитохром относят поэтому как в группу *C*, так и в группу *D*; он получил название цитохрома *cd*.

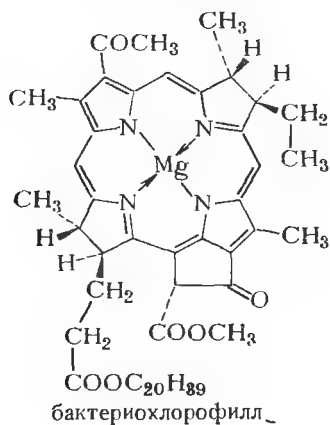
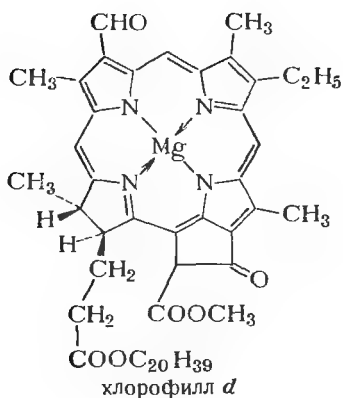
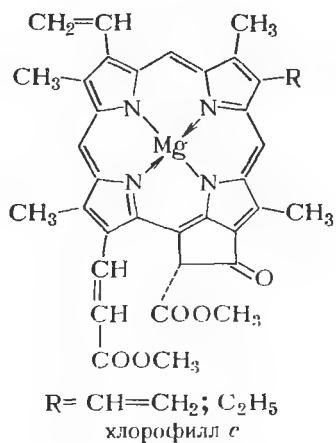
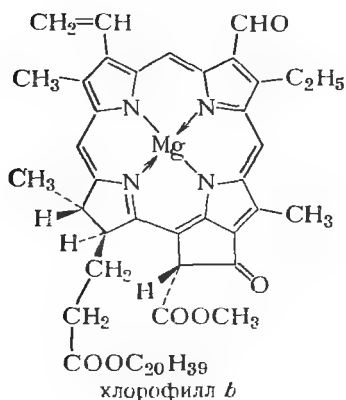
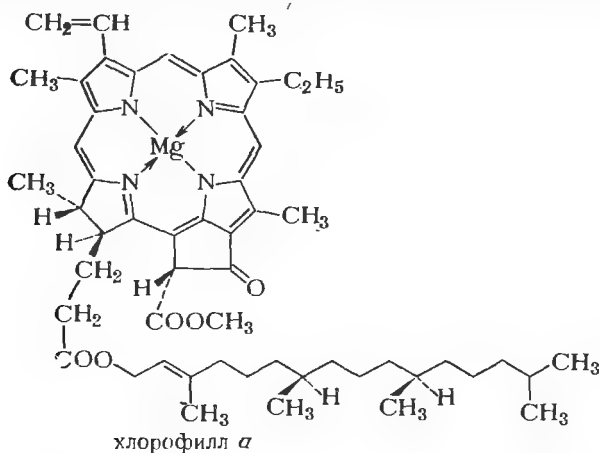
ХЛОРОФИЛЛЫ

Хлорофилл — пигмент, придающий растениям зеленую окраску. Благодаря его уникальным свойствам растения, используя энергию солнца, из воды и двуокиси углерода создают разнообразные органические вещества (глюкозу, крахмал, жиры, белки и другие соединения).

В природе встречается несколько видов хлорофиллов. В листьях растений находятся хлорофиллы *a* и *b* в соотношении приблизительно 3:1. Диатомеи, дипофлагеллаты и бурые водоросли содержат хлорофиллы *a* и *c*. Хлорофилл *d* найден в водорослях наряду с хлорофиллом *a*. Из зеленых бактерий выделен хлоробийм-хлорофилл, в пурпурных и красных серных бактериях содержится еще один хлорофилл — бак-

териохлорофилл, родственный хлорофиллам высших растений и водорослей.

В отличие от железопорфиринов — гемоглобина и цитохромов — в основе хлорофиллов лежит магниевый комплекс частично гидрированного порфинового ядра — дигидропорфина или хлорина.



Характерной особенностью структуры хлорофиллов является наличие циклопентанового кольца (изоциклическое кольцо) и остатка пропионовой кислоты в кольце IV, этерифицированного фитолом. Как и гемоглобин, хлорофилл связан с молекулой белка, и только в такой форме он физиологически активен.

Приведенная выше структурная формула хлорофилла *a* рассматривается только как простетическая группа сложного фотофермента, включающего в себя белковолипидный компонент. До настоящего времени не выделен специфический белок, образующий с хлорофиллом соединение типа фермента. Неизвестно также стехиометрическое соотношение между простетической группой и молекулой белка.

Микроскопическое изучение строения листа показывает, что хлорофилл распределен не по всей протоплазме, а сосредоточен в хлоропластах. С помощью электронного микроскопа было обнаружено, что внутри хлоропластов имеются еще более мелкие тельца — гранулы, которые и содержат хлорофилл. Помимо хлорофилла в составе хлоропластов обнаружены белки, липиды, углеводы, ферменты, витамины, вещества неорганического происхождения и ряд пигментов, например каротиноиды. Предполагают, что белок в хлоропластах также участвует в фотосинтезе благодаря наличию системы цистин—цистеин (сульфгидрильные группы — промежуточные переносчики ионов водорода).

Идея о связи хлорофилла с белком принадлежит русским ученым. Еще М. С. Цвет указывал на то, что хлорофилл в пластиде не свободен, а адсорбционно связан с белком. Им был предложен довольно удачный термин — хлороглобин, подчеркивающий сходство между гемоглобином и хлорофилл-белковым комплексом.

Дальнейшие исследования подтвердили это предположение. Для выяснения природы связи хлорофилл — белок изучали спектры комплексов хлорофилла с белками и более простыми пептидами (глицил-лейцин, пептон, альбумин, протамины). Показано, что молекулы хлорофилла связаны химическими связями с кислотными и основными группами белка. В целом вопрос о типе связи хлорофилл — белок остается пока открытым. Еще нет метода, позволяющего определить точную ориентацию молекул пигмента и других молекул внутри хлоропласта.

Электронные микрофотографии хлоропластов различных растений дают хорошее качественное подтверждение ламеллярной (пластинчатой) структуры хлоропластов. Они состоят из 20—30 параллельных липидных слоев, отделенных от водно-белковых слоев мономолекулярными пленками хлорофилла, причем гидрофильная порфириновая «головка» каждой молекулы хлорофилла входит в водно-белковый комплекс, а липофильный фитольный «хвост» — в липидный слой. Каждый липидный слой имеет толщину 5,0 нм, разделяющие же их водно-белковые слои — около 25 нм.

Наилучшим сырьем для выделения хлорофилла является крапива. Хлорофилл очень легко отделяется от белка (даже при сушке листьев); выделение чистого хлорофилла основано на хроматографических методах.

ХЛОРОФИЛЛ *a*

Из всех встречающихся хлорофиллов наиболее полно изучен хлорофилл *a* [74]. Структурная формула хлорофилла *a* была установлена Г. Фишером. Правильность предложенной структуры была подтвержде-

на полным синтезом [75], осуществленным Р. Вудвордом с сотрудниками [76], а также исследованиями Штрелла и Калоянова [77].

В молекуле хлорофилла *a* (см. стр. 166) имеется цикlopентановое кольцо с карбонильным кислородом при C_9 и карбоксильной группой при C_{10} , этерифицированной метиловым спиртом. Пиррольное ядро I содержит винильную группу, ядро IV — остаток пропионовой кислоты, этерифицированной фитолом $C_{20}H_{39}OH$. При атомах C_7 и C_8 ядра IV расположены дополнительные атомы водорода в *транс*-ориентации. Молекула содержит три асимметрических атома углерода — C_7 , C_8 и C_{13} .

Хлорофилл *a* — воскообразное, сине-черное вещество с т. пл. 117—120°C. Очень хорошо растворим в эфире, этиловом спирте, ацетоне,

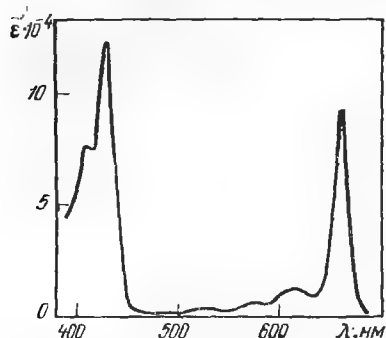


Рис. 18. Электронный спектр хлорофилла *a* в эфире.

хлороформе, сероуглероде и бензоле; плохо растворим в метиловом спирте и петролейном эфире. Спиртовой раствор сине-зеленого цвета, флуоресцирующий глубоким красным цветом. Удельное вращение хлорофилла *a* в ацетоне 262° при 20°C. Хлорофилл *a* обладает характерным электронным спектром поглощения (рис. 18) [75]. При действии на хлорофилл *a* слабых кислот, например щавелевой кислоты, отщепляется магний и образуется воскообразный феофитин *a*. При действии сильных кислот происходит не только удаление магния, но и омыление, что дает феофорбид *a*. При кипячении с содой в пиридине отщепляется карбметоксигруппа и получается пиррофеофорбид *a*. Сложноэфирную группу в боковой цепи пропионовой кислоты можно переэтерифицировать, не затрагивая магния; это достигается действием фермента хлорофиллазы в соответствующем спирте; при проведении реакции в метиловом спирте возникает метилхлорофиллид, в этиловом — этилхлорофиллид и т. д. (см. схему I на стр. 169).

При действии на хлорофилл и его производные горячих растворов щелочей расщепляется изоциклическое кольцо и возникает трикарбоновая кислота (хлорин e_6), дающая при этерификации диазометаном триметиловый эфир (см. схему II на стр. 169).

На взаимодействии хлорофилла со щелочью основана одна из его качественных реакций — реакция «фазовой пробы». При действии холодного спиртового раствора щелочи на свежеприготовленные эфирные растворы хлорофилла *a*, феофитина *a* и феофорбида *a* окраска изменяется с зеленой на желтую, а затем вновь на зеленую. Изменение окраски от зеленой до желтой вызвано образованием енола, а восстановление зеленой окраски — размыканием изоциклического кольца:

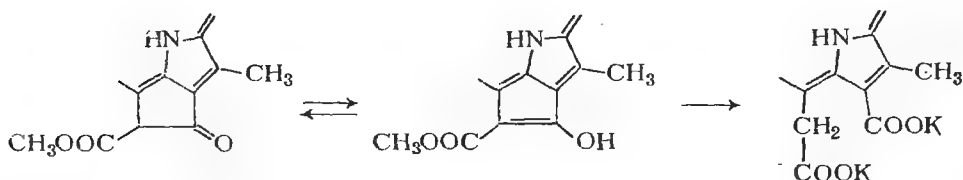


Схема I

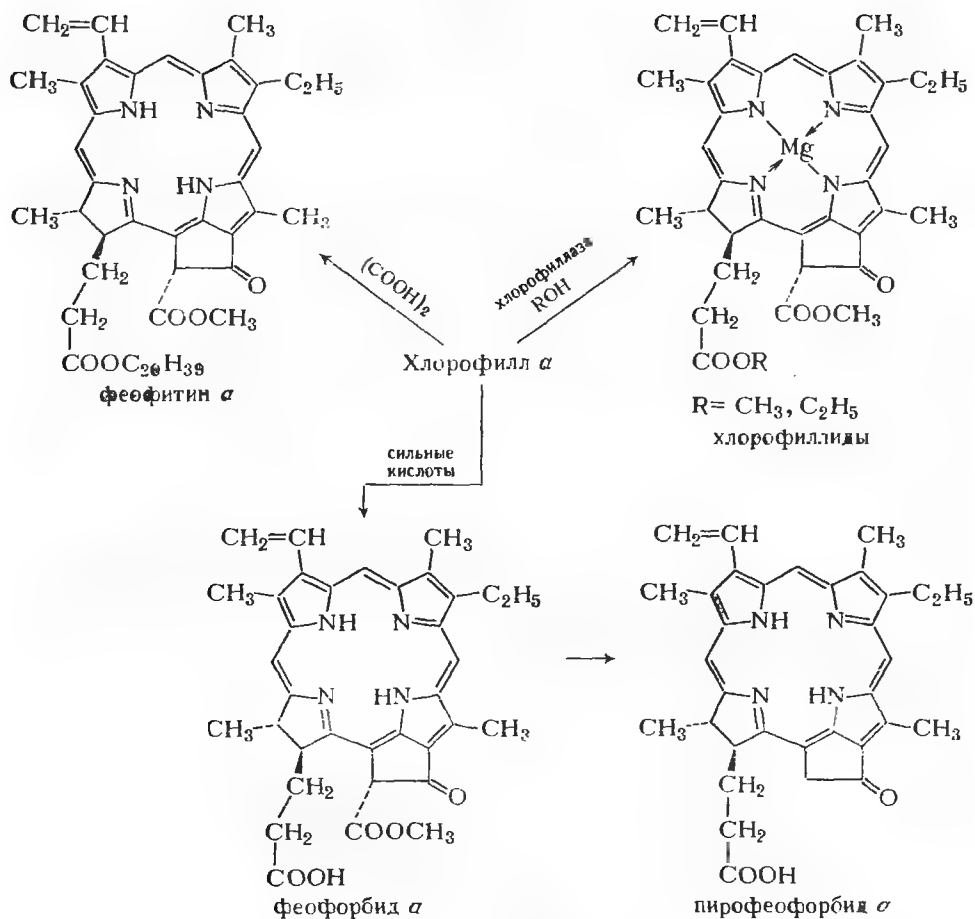
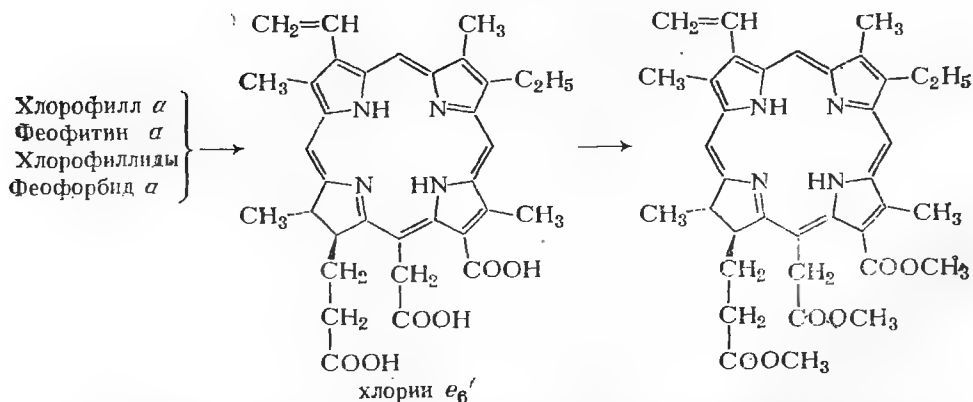
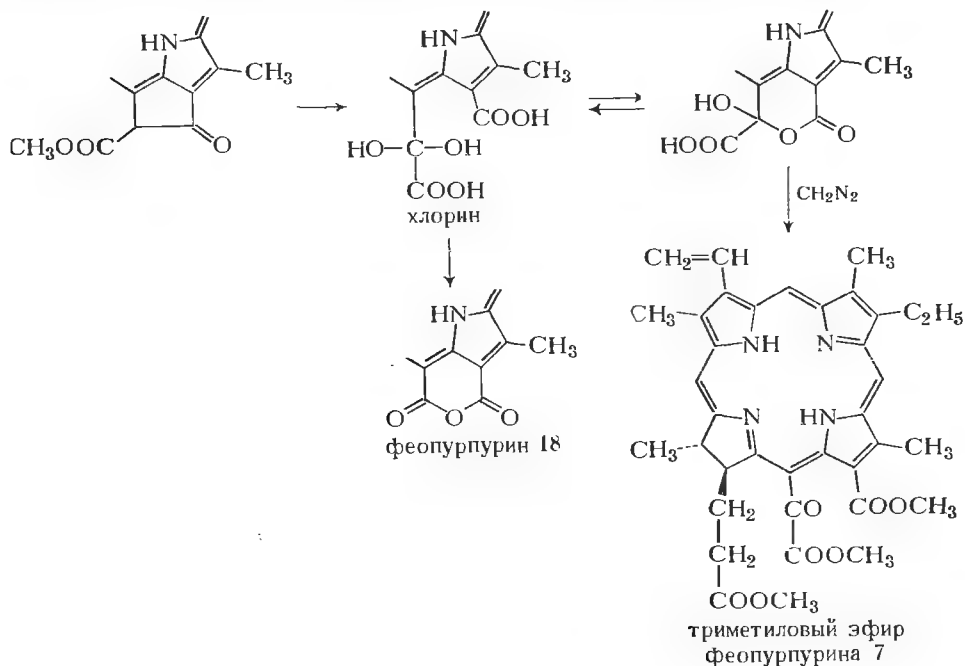


Схема II



При действии щелочи в условиях, исключающих окисление кислородом воздуха, должно было бы произойти обычное гидролитическое расщепление цикlopentanового кольца с образованием хлорина e_6 .

Однако при реакции «фазовой пробы» (при доступе кислорода воздуха) протекает окислительный гидролиз, первым продуктом которого является неустойчивый хлорин, превращающийся при стоянии в феопурпурин 18. Немедленная этерификация реакционной смеси превращает неустойчивый хлорин в триметилловый эфир феопурпурина 7:

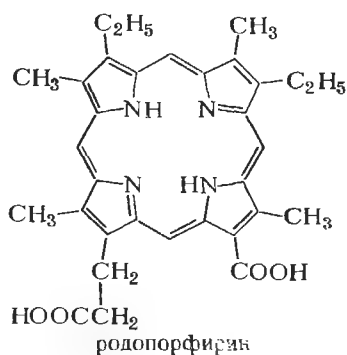
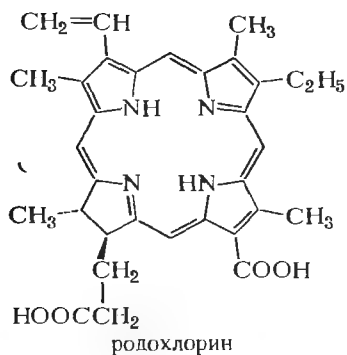
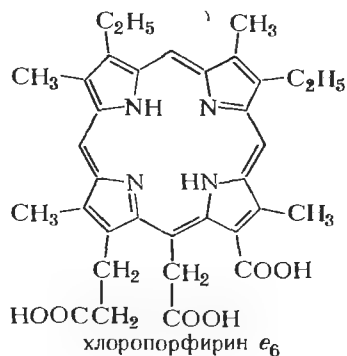
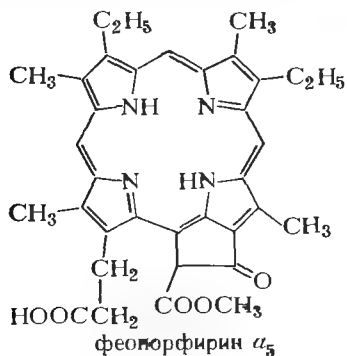


Углеродный атом в положении 10 у хлорофилла и его производных, имеющих цикlopентановое кольцо с карбметоксигруппой, легко окисляется. При этом возникает так называемый алломеризованный хлорофилл, у которого при C₁₀ стоит не атом водорода, а гидроксильная группа. Такой хлорофилл уже не способен давать реакцию «фазовой пробы», так как в положении 10 нет атома водорода, за счет которого мог бы образоваться енол. Однако все остальные реакции протекают аналогично, и «алломеризованный» хлорофилл после удаления магния, щелочного гидролиза и этерификации дает тот же самый продукт, что и неалломеризованный, — триметилловый эфир феопурпурина 7.

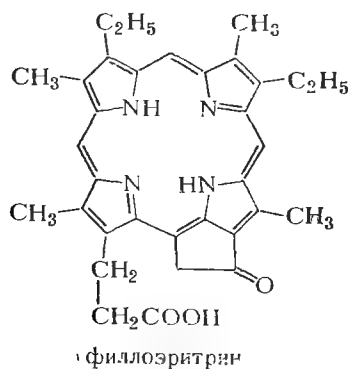
Хлорофилл *a*, так же как и гемин, при обработке щелочью в мягких условиях дает порфирины, что указывает на близкое родство между этими пигментами. Это подтверждает и тот факт, что из продуктов деструктивного восстановления хлорофилла были выделены гемопиррол, криптопиррол и филлопиррол, а из продуктов окислительного распада — имид гематиновой кислоты, как и в случае гемина.

Замещенные хлорины, являющиеся продуктами распада хлорофилла, также могут быть превращены в порфирины. При обработке хлоринов раствором иодистого водорода в уксусной кислоте при 50 °C они восстанавливаются в бесцветные лейкосоединения, вероятно, порфириногены; винильная группа при этом также восстанавливается. Окисление лейкосоединений кислородом воздуха дает порфирины.

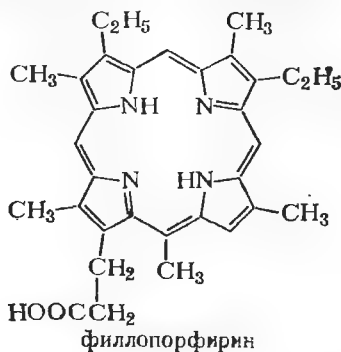
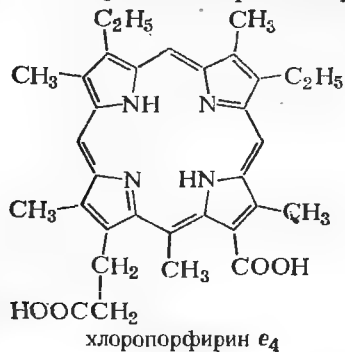
Реакция с иодистым водородом превращает феофорбид *a* в феопорфирин *a*₅, триметилловый эфир хлорина *e*₆ — в хлоропорфирин *e*₆, а родохлорин, полученный отщеплением метоксалильной группировки от γ-мостика триметиллового эфира феоурпурина 7 под действием горячей щелочи, — в родопорфирин:



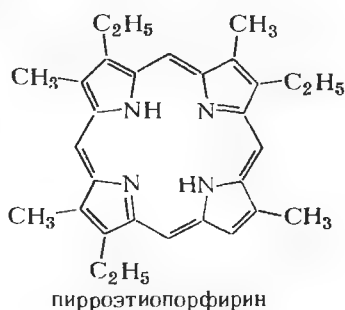
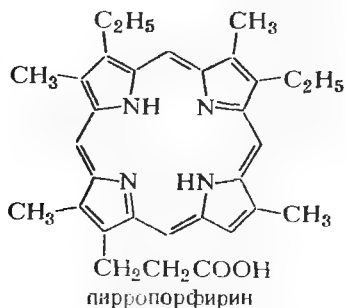
Порфирин с цикlopентаноновым кольцом — филоэритрин — возникает при продолжительном действии иодистого водорода на феопорфирин *a*₅ или пирфеофорбид *a* и при продолжительном кипячении хлорофилла *a*, феофитина *a* и хлорофиллидов с 20%-ной соляной кислотой:



Хлоропорфирин e_6 при действии муравьиной кислоты отщепляет двуокись углерода, превращаясь в хлоропорфирин e_4 , который можно декарбоксилировать в филлопорфирин:



Аналогичным образом родопорфирин дает при декарбоксилировании пирропорфирин, пиролиз которого приводит к пирроэтиопорфирину:



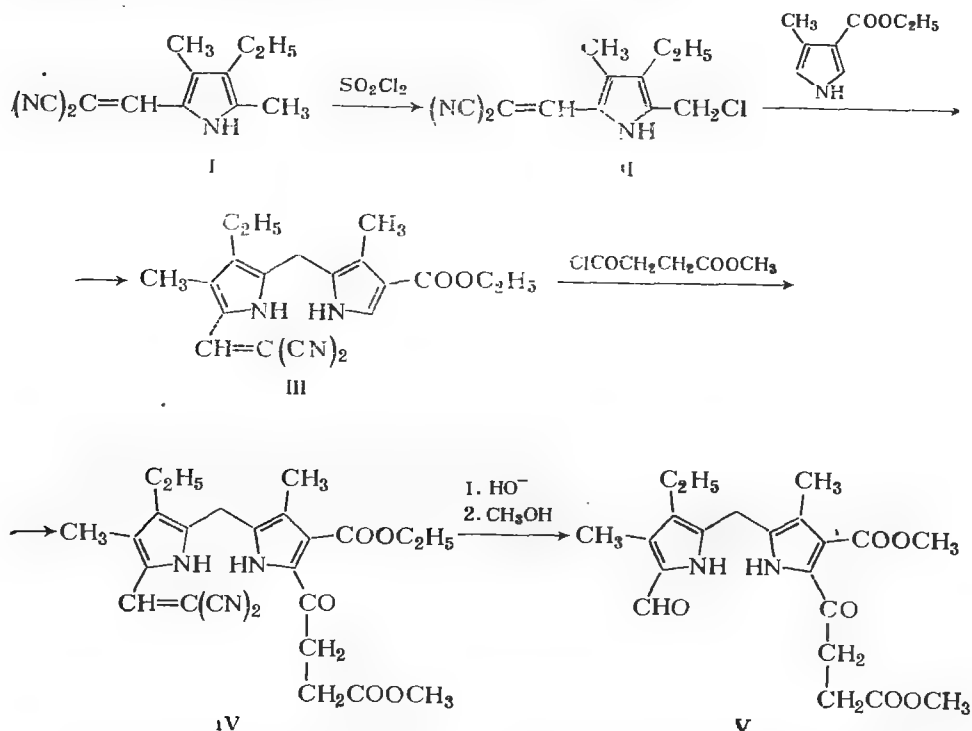
Синтез хлорофилла a . Одним из ближайших производных хлорофилла a является хлорин e_6 , триметилевый эфир которого легко превращается в хлорофилл.

В синтезе хлорина e_6 основными моментами являются порфириновая конденсация и превращение порфинового ядра в хлориновое присоединением дополнительных атомов водорода в положения 7 и 8 кольца IV. Классические синтезы порфиринов протекают в очень жестких условиях, приводят к смеси большого числа соединений и обычно дают очень малый выход. При получении относительно простых порфиринов в ряде случаев получаются вполне удовлетворительные выходы, однако для синтеза более сложных порфиринов, имеющих ряд реакционноспособных заместителей, эти способы едва ли применимы:

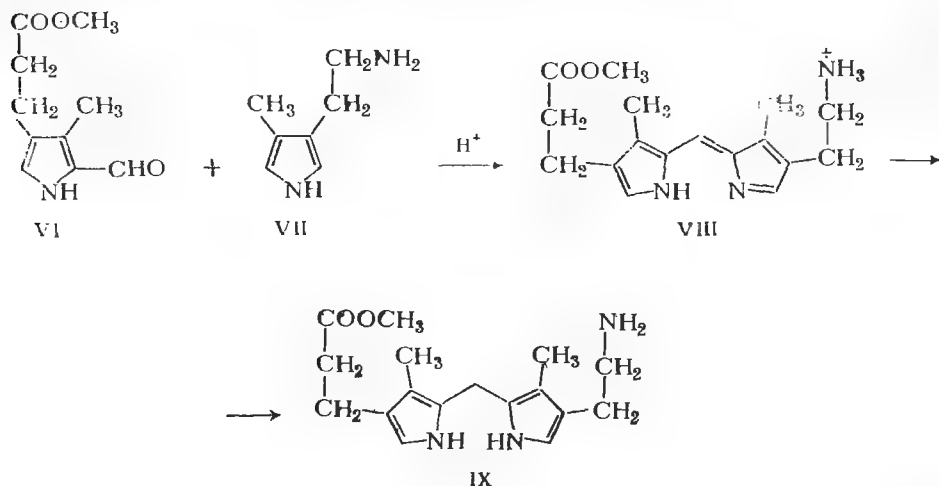
Для синтеза хлорина e_6 нужно получить два дипиррилметана с соответствующими β -заместителями — один со свободными α, α' -положениями, а другой с альдегидной и кетогруппой в α, α' -положениях. Так как альдегидная группа очень реакционноспособна, ее необходимо защитить превращением в β, β -дициановинильную группу.

2,4-Диметил-3-этил-5-(β, β -дициановинил)-пиррол I под действием хлористого сульфурла образует хлорпроизводное II, при реакции которого с 3-метил-4-карбэтоксипирролом в водно-спиртовом растворе получается дипиррилметан III. Конденсация полученного дипиррилмета-

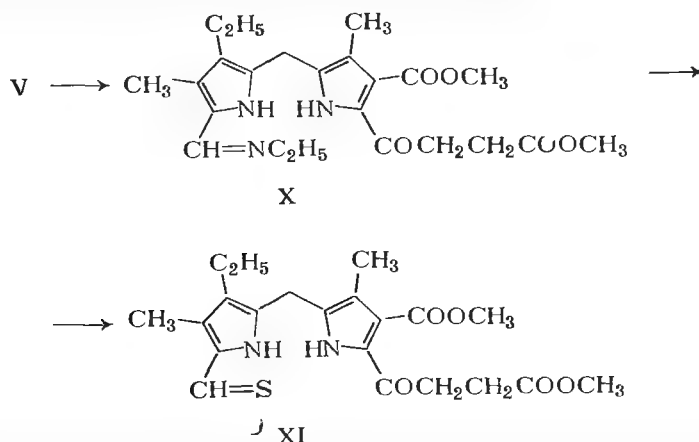
на с β -карбметоксипропионилхлоридом в присутствии хлористого цинка дает дипиррилметан IV, омыление которого едким натром и последующая этерификация полученной дикарбоновой кислоты приводит к дипиррилметану V — готовой компоненте для построения одной половины порфириновой молекулы (ядра II и III):



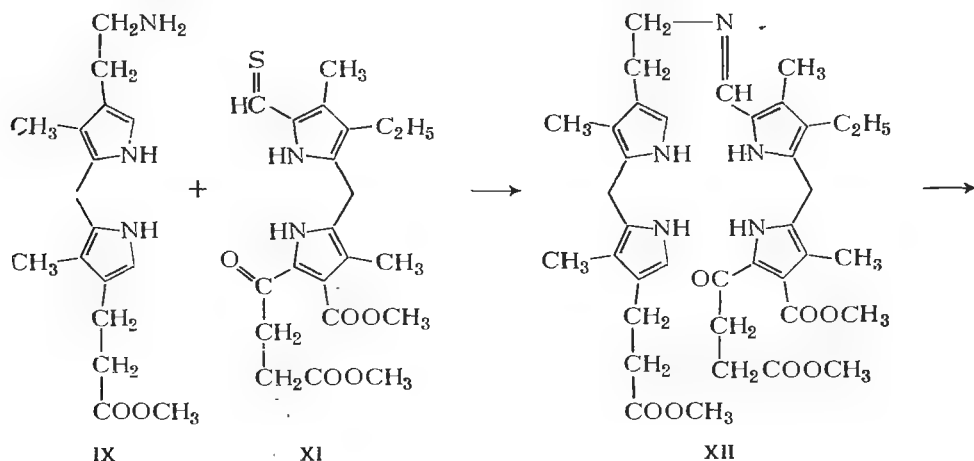
Вторая компонента получалась при конденсации 3-метил-4-карбметоксиэтилпиррол-2-альдегида VI с 3-метил-4-аминоэтилпирролом VII. Дипиррилметен VIII восстанавливался в дипиррилметан IX:

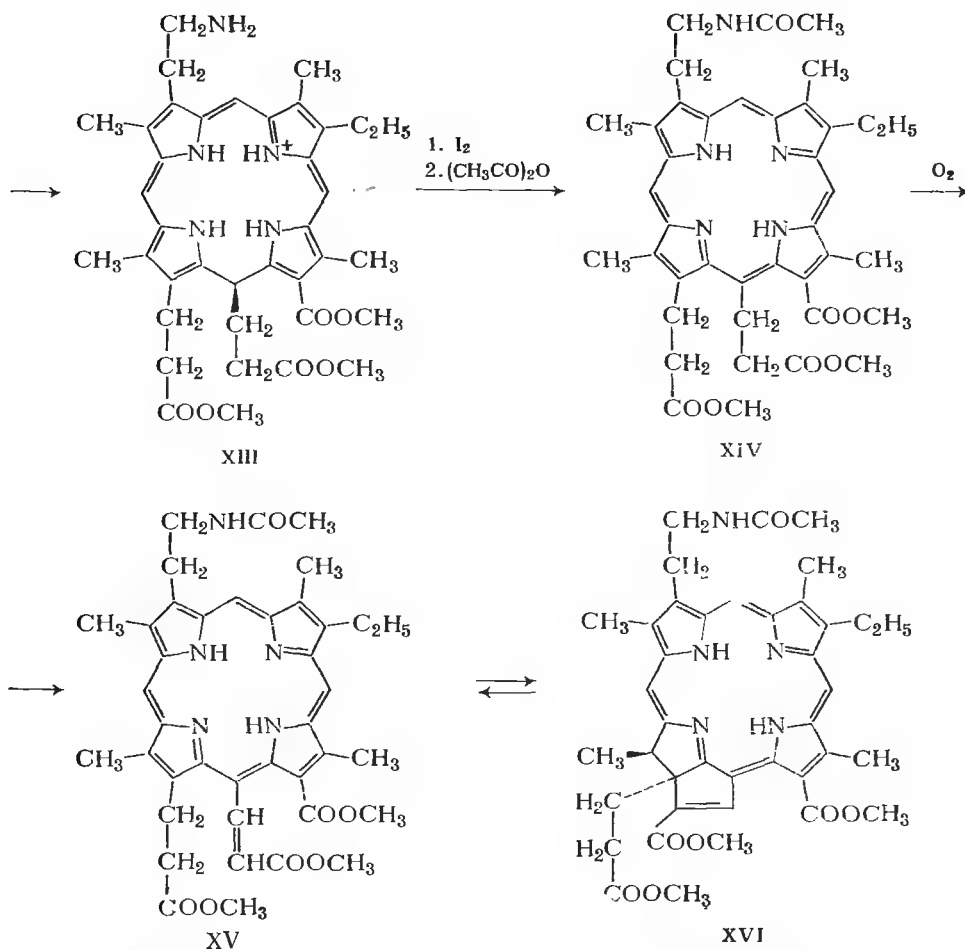


Конденсация дипиррилметанов V и IX возможна, но она привела бы к образованию двух изомерных порфиринов, так как каждая карбоксильная группа может реагировать с любым α -незамещенным положением. Чтобы избежать этого и получить только один изомер, необходимо соответствующим образом ориентировать обе компоненты в пространстве. Это достигается образованием шиффового основания путем взаимодействия аминогруппы дипиррилметана IX и альдегидной группы дипиррилметана V. Так как альдегидная группа недостаточно активна для этого, ее превращают в тиоформильную:



При конденсации соединений XI и IX получается шиффово основание XII, которое при обработке метанольным раствором хлористого водорода легко переходит в катион XIII — производное дегидропорфирина (флорина). Дегидрирование катиона XIII иодом дает порфирин, ацелированием которого получено ацетильное производное XIV. При нагревании соединения XIV в уксусной кислоте в присутствии хлорода воздуха остаток пропионовой кислоты, стоящий у γ -мостика, теряет два атома водорода и превращается в остаток акриловой кислоты. При длительном нагревании возникшего при этом порфирина XV с уксусной кислотой образуется его равновесная смесь с пурпурином XVI, которая легко разделяется благодаря их различной основности:





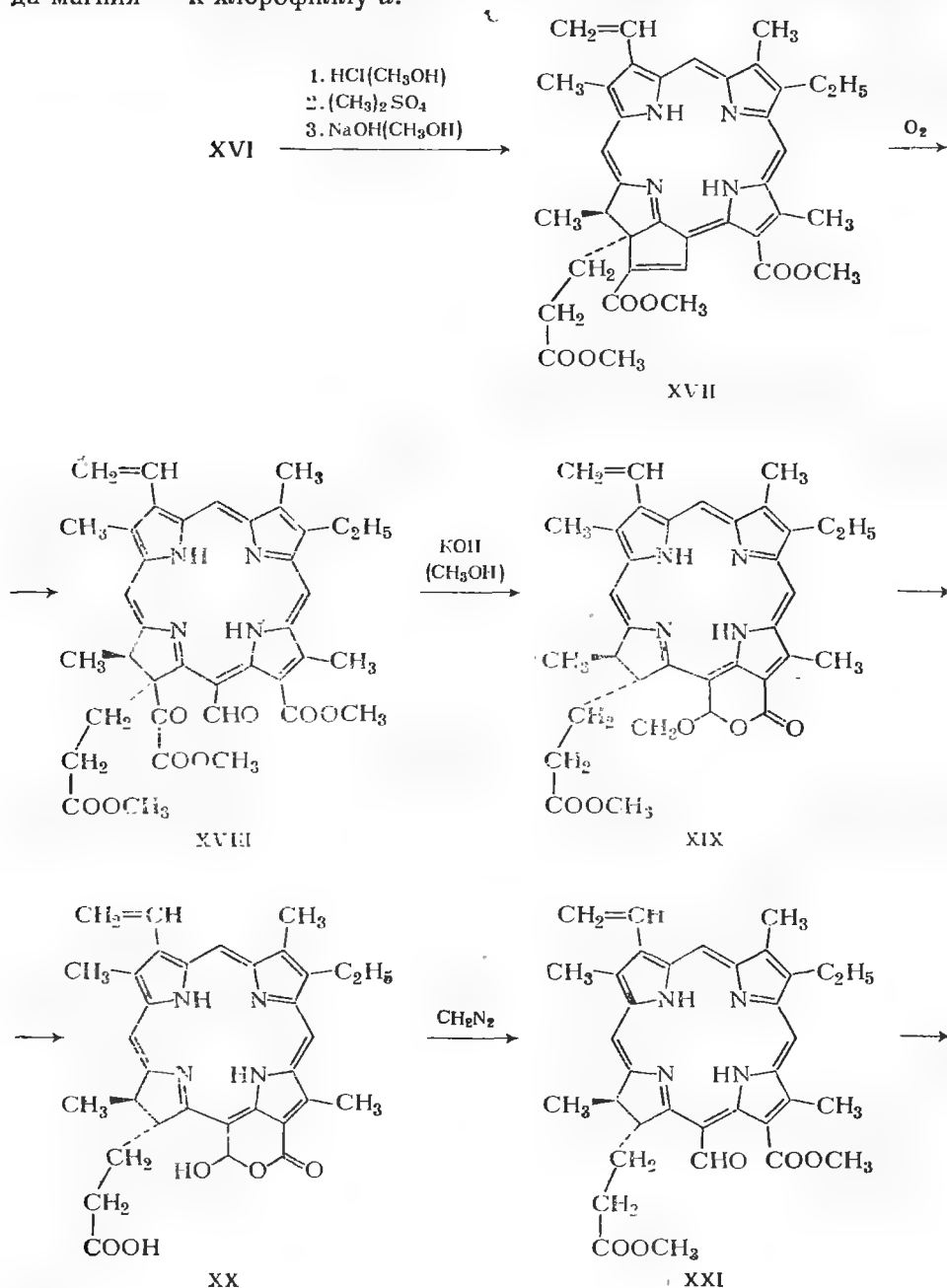
На этой стадии уже можно превратить ацетиламиноэтильную группу в винильную. Это достигается гидролизом ацетиламиногруппы в аминогруппу, исчерпывающим метилированием последней при обработке диметилсульфатом и расщеплением триметиламмониевого производного по Гофману. В результате получается винилпурпурин XVII (см. схему на стр. 176).

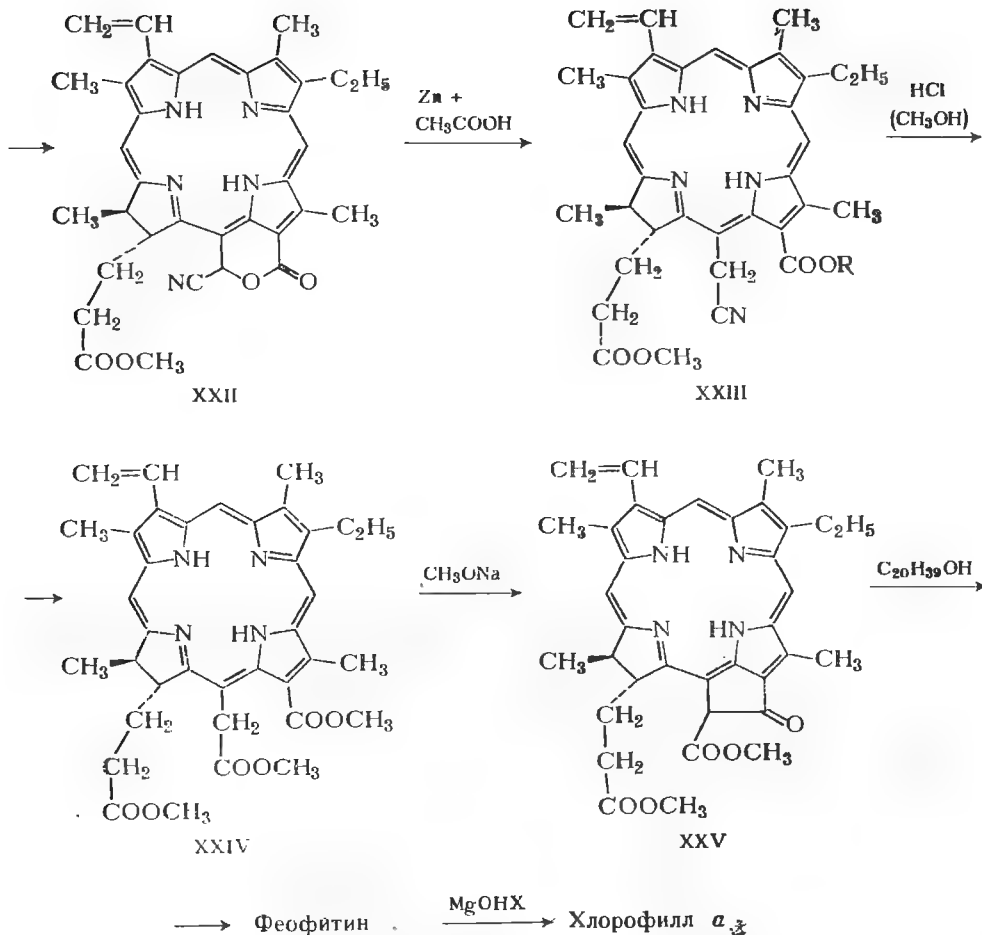
Превращением порфирина XV в пурпурин XVI уже было достигнуто введение атома водорода в положение 8 порфиринового ядра. Для введения атома водорода в положение 7 проводят окисление пурпурина XVII кислородом при интенсивном облучении видимым светом в кетоальдегид XVIII, который далее обрабатывают метанольным раствором едкого кали. Одновременно формильная группа реагирует с карб-метоксильной и образуется метоксилактон XIX, который омыляется едким натром в водном диоксане в рацемическую смесь хлоринов 5 XX.

С помощью хинина рацемат был разделен на оптически активные изомеры, и один из них оказался идентичным с природным хлорином 5, полученным из хлорофилла. При этерификации хлорина 5 диазометаном получается пурпурин 5 XXI, обработка которого синильной кислотой и триэтиламино приводит к цианолактону XXII.

Восстановление соединения XXII цинком в уксусной кислоте дает кислоту XXIII ($R=H$), которая действием диазометана переводится в метиловый эфир ($R=CH_3$); обработка эфира раствором хлористого водорода в метаноле приводит к триметиловому эфиру хлорина e_6 XXIV.

При конденсации по Дикману эфира XXIV с метилатом натрия получается метилфеофорбид a XXV, перэтерификация которого фитолом приводит к феофитину a , а действие на последний основного галогенида магния — к хлорофиллу a :





Хлорофилл *b*. Хлорофилл *b* размягчается при температуре 86—92 °С. По растворимости близок к хлорофиллу *a*. Растворы его в большинстве растворителей имеют цвет от зеленого до желто-зеленого с красной флуоресценцией.

Хлорофилл *b* отличается от хлорофилла *a* тем, что содержит в положении 3 вместо метильной группы формильную (см. стр. 166). В отличие от хлорофилла *a* хлорофилл *b* при фазовой пробе дает красно-коричневую окраску. При его пиролизе, реакции фазовой пробы и омылении получается ряд веществ, аналогичных веществам, получаемым для хлорофилла *a*, — форбиды *b* и родины, соответствующие форбидам *a* и хлоринам.

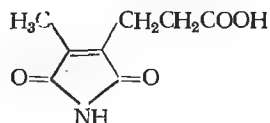
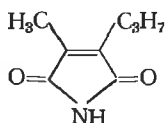
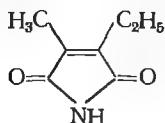
Хлорофилл с. Этот пигмент был найден наряду с хлорофиллом *а* в некоторых бурых и желтых водорослях [78]. В отличие от других хлорофильных пигментов он является производным порфирина, а не хлорина. Хлорофилл *с* представляет собой смесь монометилового эфира магнийгексадегидрофеопорфирина a_5 и монометилового эфира магнийтетрадегидрофеопорфирина a_5 [79].

Хлорофилл *d*. Структура хлорофилла *d* — пигмента красных водорослей *Rhodophyceae*, в которых он содержится наряду с хлорофиллом *a*, была установлена относительно недавно [80].

Хлорофилл *d* дает положительную фазовую пробу. После окисления его перманганатом был выделен 2-дезвинил-2-формилхлорофилл *a*. Карбоциклическое кольцо при этом не затрагивалось. Это вещество дало спектры, идентичные со спектрами ранее известного хлорофилла *a*.

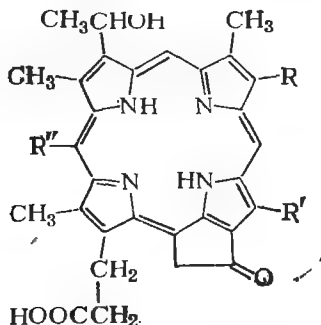
Хлоробиум-хлорофилл. При выделении пигмента из зеленых бактерий вида *Chlorobium thiosulphatophilum* было найдено, что имеется по крайней мере два типа хлоробиум-хлорофиллов, отличающиеся абсорбционными максимумами в эфирном растворе (650 и 660 нм соответственно) [81].

Хлоробиум-хлорофилл отличается от всех перечисленных выше хлорофиллов тем, что не дает реакции фазовой пробы. При окислении хлоробиум-хлорофилла выделено 3 замещенных малеинида:



Было также установлено, что остаток пропионовой кислоты этерифицирован не фитолом, а фарнезолом $C_{15}H_{25}OH$.

Исследования последних лет показали, что хлоробиум-хлорофилл представляет собой сложную смесь веществ. После превращения в феофорбиды удалось выделить шесть фракций. Исследование окислительной деградации каждой фракции и последующий синтез позволили определить их строение (табл. 11):



Фракции феофорбидов 650 отличаются алкильными заместителями в положениях 4 и 5. Феофорбиды 660 имеют дополнительно алкильный заместитель у δ -углеродного атома порфиринового кольца.

Эти порфирины аналогичны соответствующим продуктам превращения хлорофилла *a*.

Бактериохлорофилл. Формула бактериохлорофилла, выделенного из пурпурных и красных серых бактерий, была предложена Фишером на основании следующих исследований. Бактериометилфеофорбид, аналогичный метилфеофорбиду *a*, получался из бактериохлорофилла и превращался далее в триметилвый эфир бактериохлорина *e*₆; последний дегидрогенизировался в хлорофилльное производное.

Бактериохлорофилл является частично гидрированным хлорофиллом *a*, содержащим в положении 2 ацетильную группу вместо винильной. Два дополнительных водородных атома в молекуле бактериохлорофилла находятся в кольце IV у C_7 и C_8 ; это доказано превращением бактериохлорофилла путем частичной гидрогенизации в феофорбид *a*. Положение второй пары водородных атомов окончательно выяснено лишь в последнее время на основании анализа продуктов окисления бактериохлорина *e*₆ хромовой кислотой.

Т а б л и ц а 11. Хлоробиум-феофорбиды

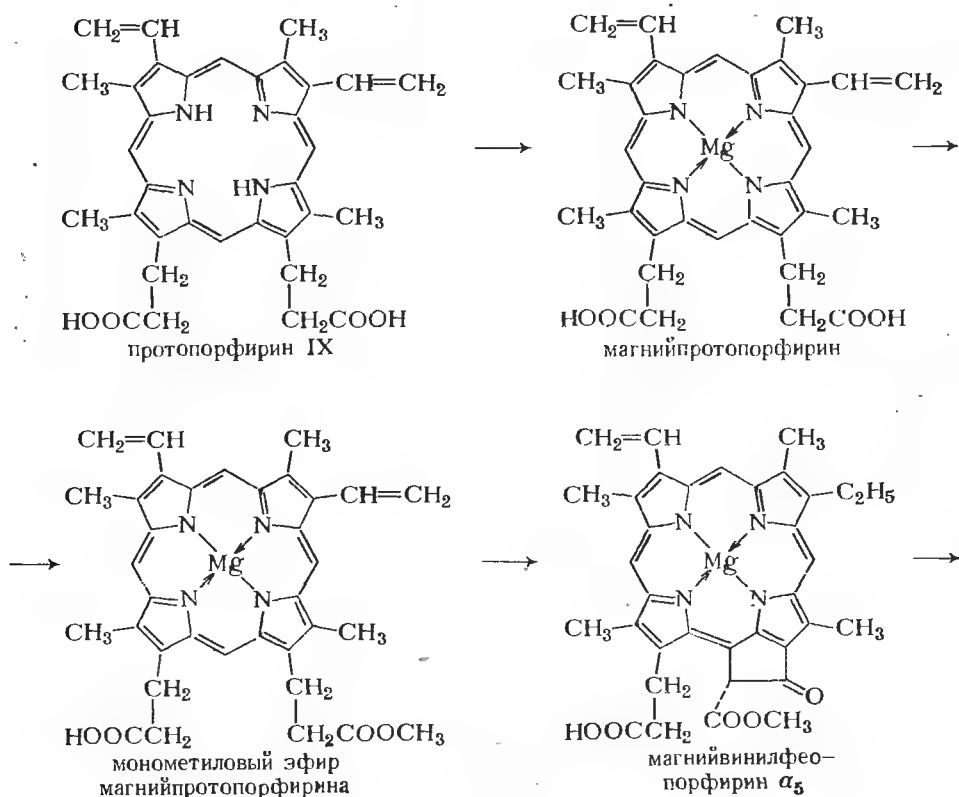
Фракции	Феофорбиды 650 ($R''=H$)		Феофорбиды 660		
	R	R'	R	R'	R''
1	$CH_2CH(CH_3)_2$	C_2H_5	$CH_2CH(CH_3)_2$	C_2H_5	C_2H_5
2	$CH_2CH_2CH_3$	C_2H_5	$CH_2CH(CH_3)_2$	C_2H_5	CH_3
3	$CH_2CH(CH_3)_2$	CH_3	$CH_2CH_2CH_3$	C_2H_5	C_2H_5
4	C_2H_5	C_2H_5	$CH_2CH_2CH_3$	C_2H_5	CH_3
5	$CH_2CH_2CH_3$	CH_3	C_2H_5	C_2H_5	CH_3
6	C_2H_5	CH_3	C_2H_5	CH_3	CH_3

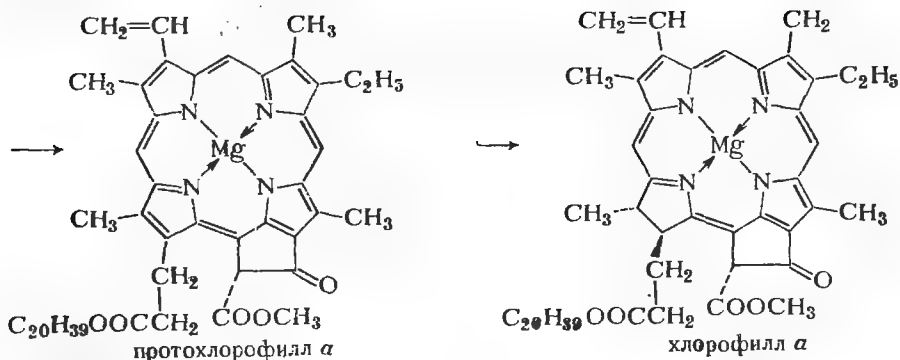
Определение абсолютной конфигурации асимметрических центров продуктов окислительного расщепления бактериохлорофилла, получающихся из колец II и IV, привело к установлению его полной структуры (см. стр. 166) [83].

БИОСИНТЕЗ ХЛОРОФИЛЛОВ

Синтез хлорофилла *in vivo* проходит через те же стадии, что синтез гема, вплоть до протопорфирина.

Каждое превращение осуществляет определенный фермент, синтез которого контролируется одним определенным геном. Если этот ген изменяется таким образом, что синтез фермента невозможен, то реакция не пройдет; произойдет обрыв биосинтетической цепи, и в системе будет накапливаться промежуточный продукт, превращение которого в следующий продукт блокировано. Так, при облучении водоросли *Chlorella*, синтезирующей хлорофилл, был получен ряд мутантов. В одном из мутантов накапливался протопорфирин, но не содержалось хлорофилла. В другом мутанте был обнаружен магнийпротопорфирин, а в третьем — монометилвый эфир магнийпротопорфирина. Один из мутантов *Chlorella* синтезировал магнийвинилфеопорфирин, но не мог превращать его в хлорофилл без освещения, как и высшие растения. Эти идентифицированные соединения позволяют, хотя и не полно, представить наиболее вероятную цепь реакций, ведущих от протопорфирина к хлорофиллу:





Магний может внедряться уже в протопорфирин IX, образуя магнийпротопорфирин.

Скорость образования магнийпорфирина увеличивается в присутствии веществ, способных связывать железо, например α, α -дипиридила, и предотвращать, таким образом, образование железопорфириновых комплексов.

Однако в случае недостаточного содержания железа синтез бактериохлорофилла приостанавливается и происходит накопление копропорфирина III.

Монометилловый эфир магнийпротопорфирина в несколько стадий превращается в магнийвинилфеопорфирин *a*₅; эти стадии включают окисление этерифицированного остатка пропионовой кислоты в β -кетоэфирную группировку, последующее присоединение метиленовой группы к α -мостику и гидрирование одной винильной группы в этильную. Магнийвинилфеопорфирин *a*₅ (протохлорофиллид *a*) этерифицируется фитолом, давая протохлорофилл *a*, который затем превращается в хлорофилл *a*.

РЕТИНИЛИДЕНПРОТЕИДЫ

К хромопротеидам относится группа сложных белков, хромофорная группа которых представлена ретиналями. Они локализируются в клетках сетчатки глаза и их называют зрительным пурпуром или зрительными пигментами. Функциональной особенностью этих белков является способность к рецепции света [84].

Наружный слой нервных клеток сетчатки — нейроэпителий или зрительный эпителий — содержит светочувствительные отростки — палочки и колбочки. По густоте и соотношению палочковых и колбочковых рецепторных элементов сетчатка неоднородна, количество палочек (75—170 млн) намного превосходит число колбочек (3—7 млн.). Колбочки ответственны за дневное, цветное зрение, для их возбуждения необходимо больше световой энергии (5—10 фотонов), чем для возбуждения палочек (1—2 фотона), ответственных за сумеречное зрение.

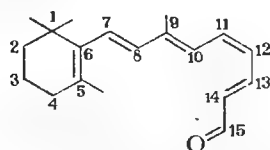
Важным элементом световоспринимающих клеток является фоторецепторная мембрана, которая образует наружный сегмент и непосредственно воспринимает световое возбуждение. Роль внутреннего сегмента сводится к трансформации световой энергии, что приводит к нервному возбуждению, передаваемому через зрительные нервы в мозг, и преобразуется в зрительные ощущения.

Фоторецепторная мембрана состоит из белка и липидов. Содержание липидов составляет 40—60% сухой массы наружных сегментов. Основную часть белка мембранной структуры наружных сегментов со-

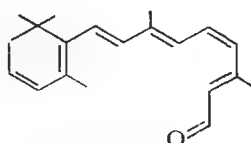
ставляет зрительный пигмент. Липидные компоненты представлены в основном фосфолипидами с высоким содержанием ненасыщенных жирных кислот — докозагексаеновой (37%), докозатетраеновой (7%) и арахидоновой (8%). Фоторецепторная мембрана имеет низкую вязкость вследствие высокого содержания ненасыщенных жирных кислот и почти полного отсутствия холестерина, молекулы зрительного пигмента в ней подвижны, причем хромофорная группа имеет постоянную ориентацию на поверхности глобулы, благоприятную для адсорбции света.

В настоящее время известно несколько зрительных пигментов. Наиболее изучен среди них родопсин, который присутствует в палочках глаз земных позвоночных животных и морских рыб ($\lambda_{\text{макс}}$ 498 нм). Зрительный пигмент палочек пресноводных рыб — порфиросин — характеризуется $\lambda_{\text{макс}}$ 522 нм. Из колбочек сетчатки глаза цыпленка выделен иодопсин ($\lambda_{\text{макс}}$ 562 нм); в колбочках кальмара и краба найден цианопсин ($\lambda_{\text{макс}}$ 620 нм). Очень интересен факт обнаружения пигмента типа родопсина в бактериях, который назван бактериородопсином ($\lambda_{\text{макс}}$ 570 нм) [85].

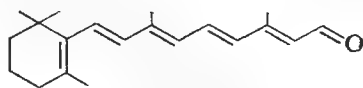
Все зрительные пигменты построены из белка опсина и хромофорной группы, представленной 11-*цис*-ретиналем или 11-*цис*-3,4-дегидроретиналем. Изопигменты (изородопсин и изопорфиросин) содержат в качестве хромофора 9-*цис*-ретиаль или 9-*цис*-3,4-дегидроретиаль, но они не находятся в сетчатке глаза. Конфигурация связи C_6-C_7-S -*цис*. В родопсине под действием света 11-*цис*-ретиаль превращается в *all*-*транс*-ретиаль:



11-*цис*-ретиаль



11-*цис*-3,4-дегидроретиаль



all-*транс*-ретиаль

Строение опсина пока не установлено, в основном из-за трудности выделения его в чистом виде. Молекулярная масса опсина точно не определена, по-видимому, наиболее достоверным следует считать значение порядка 27 000. В опсине преобладают гидрофобные остатки аминокислот, достаточно велико содержание ароматических аминокислот, присутствуют несколько остатков цистеина. Среди гидрофильных аминокислот опсина преобладают дикарбоновые.

Родопсин, по-видимому, является гликопротеином [86] и содержит остатки гексозамина и маннозы. Из смеси, полученной расщеплением родопсина пепсином, выделили гликопептид и установили аминокислотную последовательность этого фрагмента:

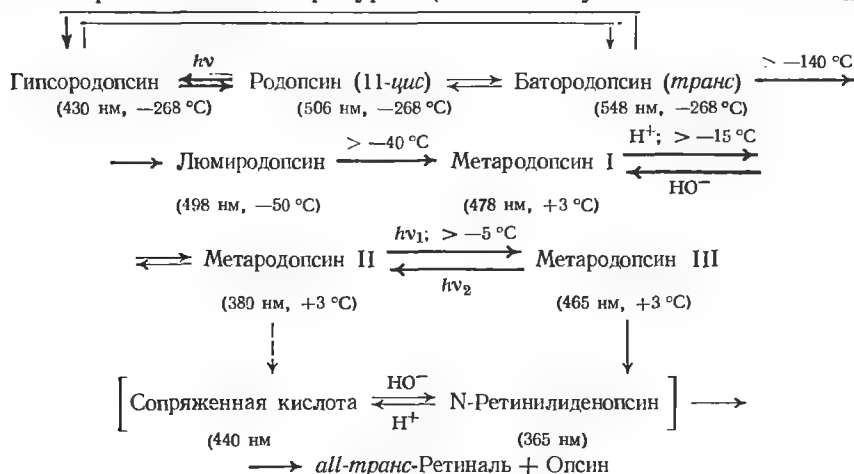


* AsX — остаток аспарагина или аспарагиновой кислоты.

Олигосахаридная цепь присоединена к полипептидной цепи гликозил-амидной связью.

Родопсин и другие зрительные пигменты содержат ковалентно связанную хромофорную группу: ретиналь соединен альдиминной связью с ϵ -аминогруппой лизина. В формировании пространственной структуры родопсина существенную роль играют также сложные вторичные взаимодействия белкового окружения с хромофорной группой.

Фотолиз родопсина. Под действием света родопсин выцветает, что сопровождается образованием ряда продуктов, которые удалось зафиксировать при низких температурах (в скобках указаны значения $\lambda_{\text{макс}}$):



Первым продуктом превращения родопсина, который удается наблюдать при температуре -250°C , является гипсородопсин. Возникновение его сопровождается фотоизомеризацией хромофора, эта реакция фотообратима. Дальнейшие продукты образуются в результате термических реакций. Гипсородопсин превращается в батородопсин (прелюмиродопсин), который переходит затем в люмиродопсин. Следующая стадия дает метародопсин I, превращающийся при дальнейшем повышении температуры в метародопсин II. Эта реакция обратима и сдвигается в сторону образования метародопсина II при повышении температуры и снижении pH среды. Метародопсин II при $+3^{\circ}\text{C}$ медленно превращается в метародопсин III. Реакция ускоряется видимым светом, а при действии ближнего ультрафиолетового света становится в значительной степени обратимой. Она сопровождается появлением в белке добавочных свободных групп SH. Метародопсин III содержит *all-транс*-ретиналь и превращается в N-ретинилиденопсин, который быстро гидролизует, давая ретиналь и опсин. В сильно кислых и сильно щелочных средах устойчивость опсина несколько повышается. Поскольку при температурах значительно выше 0°C не удается наблюдать метародопсин III, то предполагают возможность прямого превращения метародопсина II в N-ретинилиденопсин.

Изучение кинетики термических реакций процесса фотолиза показало, что наибольшие положительные изменения энтальпии и энтропии активации происходят при переходе метародопсина I в метародопсин II; вместе с тем на данной стадии наблюдается и наибольший спектральный сдвиг. Кроме того, это первое превращение, для которого нужна вода, поскольку оно сопровождается поглощением протонов молекулой

белка. Возможно, что этот переход является триггером зрительного возбуждения.

Фотолиз при физиологических температурах происходит, по-видимому, через те же промежуточные продукты.

В сетчатке глаза *all-транс*-ретинаял превращается в *11-цис*-ретинаял и вступает в ресинтез с опсином, давая родопсин. Этот процесс осуществляется в темноте. Существует система, пополняющая запасы *11-цис*-ретинаяла в сетчатке, но о ее работе пока известно очень мало.

ЛИТЕРАТУРА

1. Fischer H., Orth H. Die Chemie des Pyrrols. Bd. II/1, Leipzig, Akad. Verlag, 1937. 766 S.
2. J. Am. Chem. Soc., 1960, v. 82, № 21, p. 5574—5584.
3. Falk J. E. Porphyrins and Metalloporphyrins. Amsterdam — London — New York, Elsevier, 1964. 266 p.; The Chemical and Physical Behavior of Porphyrin Compounds and Related Structures. Ann. N. Y. Acad. Sci., 1973, v. 206, p. 1—761.
4. Блюменфельд Л. А. Гемоглобин и обратное присоединение кислорода. М., «Советская наука», 1957. 139 с.; Пюльман Б., Пюльман А. Квантовая биохимия. Пер. с англ. Под ред. Л. А. Блюменфельда. М., «Мир», 1965. 654 с.
5. Abraham R. T., Jackson A. H., Kenner G. W., J. Chem. Soc., 1961, p. 3468—3474.
6. Doddrell D., Caughey W. S., J. Am. Chem. Soc., 1972, v. 94, № 7, p. 2510—2512.
7. Battersby A. R. e. a., J. Chem. Soc., Chem. Comm., 1973, № 13, p. 441—442.
8. Abraham R. T., Hawkes G. E., Smith K. M., J. Chem. Soc., Chem. Comm., 1973, № 12, p. 401—402.
9. Battersby A. R., Hunt E., McDonald E., J. Chem. Soc., Chem. Comm., 1973, № 13, p. 442—443.
10. Евстигнеева Р. П., Мамаев В. М., Пономарев Г. В., ХГС, 1971, № 1, с. 49—50.
11. Falk J. E., J. Chromatography, 1961, v. 5, p. 277—299.
12. Хайс И. М., Мацек К. Хроматография на бумаге. Пер. с чешск. Под ред. М. Н. Запрометова. М., «Мир», 1962. 851 с.
13. Rothmund P., J. Am. Chem. Soc., 1935, v. 57, № 10, p. 2010—2011.
14. Adler A. D. e. a., J. Org. Chem., 1967, v. 32, p. 476.
15. Siedel W., Winkler F., Ann., 1943, Bd. 554, S. 162—201.
16. Treibs A., Ott W., Ann., 1958, Bd. 615, S. 137—164.
17. Bullock E. e. a., J. Chem. Soc., 1958, p. 1430—1440.
18. Mauzerall D., J. Am. Chem. Soc., 1960, v. 82, № 10, p. 2601—2609.
19. Markovac A., MacDonald S. F., Can. J. Chem., 1965, v. 43, № 12, p. 3364—3371.
20. Morsingh F., MacDonald S. F., J. Am. Chem. Soc., 1960, v. 82, № 8, p. 4377—4384.
21. Tarlton E. J., MacDonald S. F., Baltazzi E., J. Am. Chem. Soc., 1960, v. 82, № 8, p. 4389—4395.
22. Marks G. S. e. a., J. Am. Chem. Soc., 1959, v. 81, № 1, p. 250.
23. Archibald J. L. e. a., Can. J. Chem., 1966, v. 44, № 3, p. 345—362.
24. MacDonald S. F., Michl K.-H., Can. J. Chem., 1956, v. 34, № 42, p. 1768—1781.
25. Arsenault G. P., Bullock E., MacDonald S. F., J. Am. Chem. Soc., 1960, v. 82, № 8, p. 4384—4389.
26. Badger G. M., Jones R. A., Laslett R. L., Austral. J. Chem., 1964, v. 17, № 10, p. 1157—1163.
27. Jackson A. H., Kenner G. W., Warburton D., J. Chem. Soc., 1965, p. 1328—1337.
28. Склад Ю. Е., Евстигнеева Р. П., Преображенский Н. А., ХГС, 1965, № 4, с. 633.
29. Лузгина В. Н. и др. ЖОХ, 1966, т. 36, № 7, с. 1206—1210.
30. Овсепян Т. Р., Евстигнеева Р. П., Преображенский Н. А., ЖОХ, 1966, т. 36, № 5, с. 806—807.
31. Collier G. L., Jackson A. H., Kenner G. W., J. Chem. Soc., (C), 1967, p. 66—72.
32. Clezy P. S., Nichol A. W., Austral. J. Chem., 1965, v. 18, № 11, p. 1835—1845.
33. Jackson A. H., Kenner G. W., Smith K. M., J. Am. Chem. Soc., 1966, v. 88, № 19, p. 4539—4541; Smith K. M. Recent development in the chemistry of pyrrolic compounds. Quart. Revs., 1971, v. 25, № 1, p. 31—85.
34. Johnson A. W., Kay I. T., J. Chem. Soc., 1961, p. 2418—2423.
35. Mironov A. F., Evstigneeva R. P., Preobrazhensky N. A., Tetrahedron Lett., 1965, № 3, p. 183—188.
36. Евстигнеева Р. П. и др., ЖОХ, 1969, т. 39, № 11, с. 2558—2563.
37. Cox M. T. e. a., Chem. Comm., 1967, № 21, p. 1141—1142.
38. Harris R. L. N., Johnson A. W., Kay I. T., J. Chem. Soc., (C), 1966, p. 22—29.

39. Пономарев Г. В. и др., 1972, № 2, с. 202—206.
40. Bamfield P. e. a., J. Chem. Soc., (C), 1966, p. 1436—1443.
41. Bamfield P. e. a., Chem. Comm., 1967, № 20, p. 1029—1030.
42. Евстигнеева Р. П., Миронов А. Ф., Флейдерман Л. И., ДАН СССР, 1973, т. 210, № 5, с. 1090—1093.
43. Jackson A. H., Kenner G. W., Sach G. S., J. Chem. Soc., (C), 1967, p. 2045—2059.
44. Carr R. P. e. a., Chem. Comm., 1967, № 20, p. 1025—1027.
45. Jackson A. H., Kenner G. W., Wass J., Chem. Comm., 1967, № 20, p. 1027—1029.
46. Carr R. P. e. a., J. Chem. Soc., (C), 1971, p. 487—502; Jackson A. H., Smith K. M., "Synthesis", 1973, v. 1, p. 143—278.
47. Grigg R., Johnson A. W., Roche M., J. Chem. Soc., (C), 1970, p. 1928—1934.
48. Rhinesmith H. S., Schroeder W. A., Martin N., J. Am. Chem. Soc., 1958, v. 80, № 13, p. 3558—3361.
49. Liebold B., Braunitzer G., Z. physiol. Chem., 1959, Bd. 315, S. 271—277.
50. Braunitzer G. e. a., Angew. Chem., 1959, Bd. 71, № 11, S. 376.
51. Rudloff V., Braunitzer G., Z. physiol. Chem., 1961, Bd. 323, S. 129—144.
52. Svedberg T., Fahrdens R., J. Am. Chem. Soc., 1926, v. 48, № 2, p. 430—442.
53. Тейлор Дж. Молекулярная генетика. Ч. I. Пер. с англ. Под ред. А. Н. Белозерского. М., «Мир», 1964. 570 с.
54. Ingram V. M., Stretton A. O. W., Biochim. Biophys. Acta, 1962, v. 63, p. 20—33.
55. Perutz M. F. e. a., Nature, 1968, v. 219, p. 131—139.
56. Kendrew J. C. e. a., Nature, 1960, v. 185, p. 422—427.
57. Перуц М. В кн.: Молекулы и клетки. Пер. с англ. Под ред. Г. М. Франка. М., «Мир», 1966. 186 с.
58. Чернышев В. П., Филиппович Е. И., Евстигнеева Р. П. Хим.-фарм. ж., 1971, № 1, с. 32—41.
59. Perutz M. F., Nature, 1970, v. 228, p. 726—734; 734—739; Perutz M. F. e. a., Biochemistry, 1974, v. 13, № 10, p. 2163—2173, 2174—2186, 2187—2200.
60. Шаронов Ю. А., Шаронова Н. А., Мол. биол., 1975, т. 9, № 1, с. 145—172.
61. Edmundson A. B., Nature, 1963, v. 198, p. 354—357.
62. Porphyrins and related compounds, Ed. T. W. Goodwin. L., Acad. Press, 1968. 174 p.
63. Battersby A. R., Hunt E., McDonald E., J. Chem. Soc., Chem. Comm., 1973, № 12, p. 442—443.
64. Lemberg R., Legge J. W. Hematin compounds and bile pigments. New York — London, Interscience, 1949. 748 p.
65. Gray C. H. The bile pigments. N. Y., Wiley a. Sons, 1953. 142 p.
66. Gray C. H. Bile pigments in health and disease. Springf. Ill. Thomas, 1961. 101 p.
67. Рачев Л., Тодоров И., Стаева Ст. Обмен веществ в детском возрасте. София. «Медицина и физкультура», 1962. 423 с.
68. Классификация и номенклатура ферментов. Отчет комиссии по ферментам Международного биохимического союза. М., Издательство, 1962. 200 с.
69. Lemberg R., Adv. in enzymology, 1961, v. 23, p. 265—321.
70. Seyffert R., Grassl M., Lynen F. In: Hemes and hemoproteins. Ed. by Chance B., Estabrook R. W., Yonetani T., New York — London, Academic Press, 1966. 624 p.; Smythe G. A., Caughey W. S., J. Chem. Soc., Chem. Comm., 1970, № 13, p. 809—811.
71. Mathews F. S., Levine M., Argos P., J. Mol. Biol., 1972, v. 64, p. 449—464.
72. Dickerson R. E. e. a., J. Biol. Chem., 1971, v. 246, № 5, p. 1511—1535.
73. Dickerson R. E. e. a., J. Biol. Chem., 1967, v. 242, № 12, p. 3015—3018.
74. Inhoffen H. H., Buchler J. W., Yüger P. Chemie der Chlorine und Porphyrine in Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe. Wien — New York, Herausgeber L. Zechmeister Springer Verlag, 1968. S. 284—355.
75. Гуринович Г. П., Севченко А. Н., Соловьев К. Н. Спектроскопия хлорофилла и родственных соединений. Минск, «Наука и техника», 1968. 517 с.
76. Woodward R. B. e. a., J. Am. Chem. Soc., 1960, v. 82, № 14, p. 3800—3802; Woodward R. B., Angew. Chem., 1960, v. 72, № 18, p. 651—662.
77. Strell M., Kaloyanoff A., Angew. Chem., 1960, Bd. 72, № 5, S. 169—170.
78. Hill R., "Comprehensive Biochemistry", 1963, v. 9, p. 73—97.
79. Dougherty R. C. e. a., J. Am. Chem. Soc., 1966, v. 88, № 21, p. 5037—5038.
80. Holt A. S., Morley H. V., Can. J. Chem., 1959, v. 37, № 3, p. 507—514.
81. Holt A. S., Morley H. V., J. Am. Chem. Soc., 1960, v. 83, № 2, p. 500—501.
82. Purdie J. W., Holt A. S., Can. J. Chem., 1965, v. 43, № 12, p. 3347—3353; 1966, v. 44, № 1, p. 88—93; Archibald J. L. e. a., Can. J. Chem., 1966, v. 44, № 3, p. 345—362.
83. Brockmann H., Angew. Chem., 1968, Bd. 80, № 6, S. 233—234.
84. Wald G., Exp. Eye Res., 1974, v. 18, № 3, p. 333—343.
85. Osterheld D., Stoerkenius W., Nature. New Biology, 1971, v. 233, № 39, p. 149—152.
86. Механизмы работы рецепторных элементов органов чувств. Л., «Наука», 1973. 199 с.

III. ЛИПИДЫ И ЛИПОПРОТЕИДЫ

Липиды составляют вместе с белками и углеводами основную массу органического вещества живой клетки. Они присутствуют в организмах различного происхождения: растительных, животных, бактериальных. В высокой концентрации липиды (особенно фосфолипиды) обнаружены в различных органах животных и человека: головном и спинном мозге, крови, печени, сердце, почках и т. д., особенно велико содержание липидов в нервной системе (20—25%). Липиды входят в состав всех структурных элементов клетки, в первую очередь клеточных мембран, и мембран субклеточных частиц; липиды (в виде липопротеидов) составляют не менее 30% общей сухой массы мембраны. С участием липидов протекают такие важнейшие биохимические процессы, как передача нервного импульса, активный перенос через мембраны, транспорт жиров в плазме крови, синтез белка и другие ферментативные процессы, особенно процессы, связанные с цепью переноса электронов и окислительным фосфорилированием.

Многообразие функций липидов в жизни клетки обуславливает ту важную роль, которую они выполняют в энергетических процессах, в защитных реакциях организма, в созревании и старении его, в развитии различных патологических состояний и т. д.

КЛАССИФИКАЦИЯ ЛИПИДОВ

В последние годы достигнут ряд успехов в химии и биохимии липидов. Однако до настоящего времени отсутствуют строгая классификация липидов и критерии принадлежности к данному классу биологически активных природных веществ. Так, к липидам пытаются отнести все вещества гидрофобного характера, включая не только производные высших жирных кислот, спиртов и альдегидов, но и терпены, стероиды, витаминны, пигменты и т. д. Часто классификацию липидов осуществляют и на основе их растворимости, что, однако, не отражает их строения.

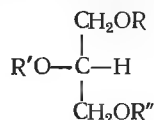
Отсутствие единой классификации липидов, по-видимому, в первую очередь обусловлено крайним разнообразием их структурных компонентов. В составе липидов обнаружены высшие жирные кислоты, спирты, альдегиды, различные полиолы, углеводы, азотистые основания, аминокислоты, холестерин, аминокислоты, фосфорная и фосфоновая кислоты и другие соединения, между которыми могут образовываться разнообразные связи (сложноэфирная, простая эфирная, гликозидная, амидная, фосфодизэфирная, фосфоноэфирная и другие). Если учесть, что эти

компоненты могут иметь различную длину цепи, степень ненасыщенности, различные функциональные группы и различную конфигурацию двойных связей и т. д., то станет понятным крайнее разнообразие структуры липидов.

К липидам целесообразно относить природные биологически активные производные высших жирных кислот, спиртов и альдегидов. Этим определением мы и будем руководствоваться в данной книге.

Все липиды можно разделить на три основные группы.

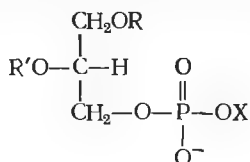
1) Нейтральные липиды, к которым следует отнести производные высших жирных кислот, спиртов и альдегидов, общей формулы



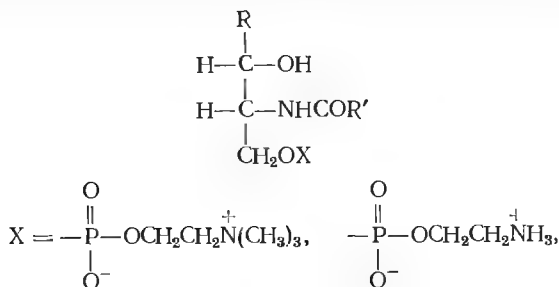
обладающие гидрофобными свойствами: триглицериды (R —ацил), нейтральные плазмалогены ($\text{R}-\text{OCH}=\text{CHR}'''$), алкилдиацилглицерины (R — алкил), гликозилдиглицериды (R — гликозильный остаток).

К этой же группе можно отнести диольные липиды, простые и сложные эфиры холестерина и разнообразные гликолипиды.

2) Фосфолипиды, содержащие наряду с указанными гидрофобными компонентами (R , R') гидрофильные остатки (X), в качестве которых могут выступать фосфорная или фосфоновая кислоты и связанные с ними азотистые основания, аминокислоты, полиолы и т. д.:



3) Сфинголипиды — липиды, содержащие длинноцепные аминодиолы (сфингозиновые основания) и имеющие общую формулу



остаток моно- или олигосахарида и т. д.

ВЫДЕЛЕНИЕ ЛИПИДОВ

Выделение липидов из природных источников является сложным и трудоемким процессом и включает следующие основные этапы: экстракцию, фракционирование на классы (нейтральные, фосфорсодержащие) и на отдельные типы липидов внутри каждого класса, разделение каждого типа нейтральных и фосфорсодержащих липидов на отдельные мо-

лекулярные виды в зависимости от структуры гидрофобной компоненты (длина цепи и степень ненасыщенности).

Известно, что в клетках различных организмов основная часть липидов присутствует в виде комплексов с белками — липопротеидов, которые разрушаются в процессе экстракции липидов различными органическими растворителями [петролейный эфир, хлороформ, диэтиловый эфир или смесь растворителей различной полярности, например хлороформ — метиловый спирт (2:1), этиловый спирт — диэтиловый эфир (3:2)]. При экстракции необходимо учитывать факторы, которые могут влиять на изменение структуры липидов: температура, свет, кислород воздуха, действие липолитических ферментов и другие. Липиды способны растворять многие нелипидные компоненты (углеводы, аминокислоты, пептиды, мочевины и другие), а также образовывать с ними комплексы, что загрязняет липидные экстракты. Удаление этих примесей достигается промыванием липидного экстракта водой и насыщенными растворами минеральных солей или хроматографированием на колонках с различными адсорбентами.

Общий липидный экстракт ткани, содержащий, как правило, нейтральные липиды и фосфолипиды, далее обрабатывают ацетоном для осаждения нерастворимых в ацетоне фосфолипидов или непосредственно проводят разделение нейтральных липидов и фосфолипидов с помощью хроматографии на колонках с различными адсорбентами или в тонком слое силикагеля или кремневой кислоты.

Фракционирование нейтральных липидов и фосфолипидов на отдельные типы соединений является значительно более сложной задачей в связи с близостью их физико-химических свойств.

ФРАКЦИОНИРОВАНИЕ НЕЙТРАЛЬНЫХ ЛИПИДОВ

Разделение нейтральных липидов на отдельные типы соединений (эфиры холестерина, моно-, ди- и триглицериды, алкилдиглицериды, нейтральные плазмалогены) и фракционирование каждой группы по степени ненасыщенности и длине цепи гидрофобного компонента достигается с помощью различных видов хроматографии [1].

Наиболее удобным и воспроизводимым является метод фракционирования на кремневой кислоте и силикагеле, так как на этих адсорбентах возможность изомеризации, гидролиза и других химических изменений довольно ограничена. При хроматографировании на кремневой кислоте вымывание нейтральных липидов в зависимости от их полярности происходит в следующей последовательности: углеводороды, эфиры холестерина, триглицериды, высшие жирные кислоты, холестерин, диглицериды, моноглицериды [2].

В настоящее время для разделения и структурного анализа нейтральных липидов преимущественно используют различные варианты тонкослойной хроматографии (ТСХ) и газо-жидкостную хроматографию (ГЖХ). Так, с помощью тонкослойной хроматографии на силикагеле и кремневой кислоте разделяют нейтральные плазмалогены, триглицериды и алкилдиглицериды в нативном виде или в виде их производных. Широкое распространение метод тонкослойной хроматографии в сочетании с денситометрическим методом получил для количественного анализа отдельных классов нейтральных липидов [3].

Импрегнирование адсорбентов различными агентами в большинстве случаев улучшает их разделяющую способность. Так, изомерные 1- и

2-моноглицериды и 1,2- и 1,3-диглицериды могут быть разделены с помощью хроматографии в тонком слое силикагеля, пропитанного борной кислотой. Образование боратных комплексов предотвращает изомеризацию 2-моноглицеридов и 1,2-диглицеридов в более устойчивые 1-моноглицериды и 1,3-диглицериды и улучшает условия разделения изомеров.

Для разделения глицеридов по степени ненасыщенности широкое развитие получила хроматография в тонком слое силикагеля, пропитанного AgNO_3 [4]. Этот метод наиболее эффективен для разделения смесей триглицеридов, содержащих моно-, ди- и триеновые кислоты состава C_{18} . Данным способом удается также разделить *цис*- и *транс*-изомеры нейтральных плазмалогенов. Однако при разделении 1,2- и 2,3-диацилглицеринов возможна ацильная миграция, в связи с чем их целесообразно предварительно переводить в ацетаты [4].

Для фракционирования глицеридов по длине цепи и степени ненасыщенности используют также распределительную хроматографию на колонках или в тонком слое адсорбента. В этом случае адсорбент (главным образом силикагель) пропитывают силиконовым или парафиновым маслом.

Определенные трудности возникают при разделении глицеридов, которые образуют так называемые критические пары, возникающие вследствие того, что уменьшение длины цепи на два атома углерода эквивалентно увеличению полярности молекулы при введении *цис*-двойной связи.

Примером подобной «критической пары» могут служить трипальмитоин и триолеин. Разделение «критических пар» при распределительной ТСХ частично достигается проведением ее в условиях низкой температуры ($4-6^\circ\text{C}$) [5, v. 2, p. 363—421] или в результате многократного проявления хроматограммы.

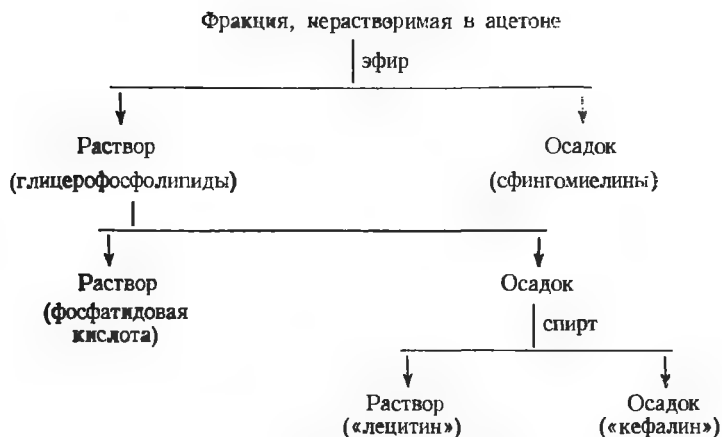
Эффективное разделение глицеридов, например триглицеридов, можно осуществить при хроматографировании их на силикагеле, пропитанном AgNO_3 , и последующем разделении каждой фракции с помощью обращенно-фазовой распределительной хроматографии.

Наиболее удобным и точным методом разделения природных глицеридов по длине цепи присутствующих жирнокислотных остатков (т. е. по молекулярной массе) является метод газо-жидкостной хроматографии [5, v. 1, p. 239—337]. При этом в ряде случаев целесообразно провести предварительное разделение смеси глицеридов на насыщенную и ненасыщенную фракции с помощью ТСХ на силикагеле, импрегнированном AgNO_3 . В этом случае удастся разделить триглицериды, длина цепи которых отличается на один атом углерода. С помощью ГЖХ проведено фракционирование триглицеридов ряда растительных масел и животных жиров.

Для устранения ацильной миграции и разложения в процессе хроматографии моно- и диглицериды разделяют в виде различных производных: ацетатов, триметилсилильных эфиров и т. д. [6].

ФРАКЦИОНИРОВАНИЕ ФОСФОЛИПИДОВ

Один из методов разделения фосфолипидов на классы основан на фракционированном осаждении из различных растворителей. Так, выделение «кефалиновой» и «лецитиновой» фракций проводится следующим образом:



Фракции «лецитин» и «кефалин» не являются индивидуальными соединениями, а представляют собой фосфолипидные концентраты с преобладанием в них фосфатидилхолинов и фосфатидилэтаноламинов.

Разделение фракции «кефалин» на фосфатидилэтаноламины, фосфатидилсерины и инозитфосфатиды было осуществлено на основании различной растворимости этих соединений в смеси спирт — хлороформ. При добавлении спирта к раствору фракции в хлороформе сначала осаждаются наименее растворимые инозитфосфатиды, далее серинфосфатиды, а фосфатидилэтаноламины остаются в растворе. Для разделения фракции «лецитин» используют способность лецитина к образованию комплекса с хлористым кадмием.

Фракционированное осаждение фосфолипидов вследствие ряда недостатков (неполнота осаждения фосфолипидов, многократное повторение процесса, получение недостаточно чистых фосфолипидов) постепенно вытесняется методами хроматографии.

Разделение фосфолипидов на классы обычно осуществляют с помощью адсорбционной хроматографии на колонках с кремневой кислотой, силикагелем или тонкослойной хроматографией на силикагеле. В ряде случаев проводят предварительное разделение кислых и нейтральных фосфолипидов на колонках с модифицированными целлюлозами (ДЭАЭ- и ТЭАЭ-целлюлозы) [7, р. 272]. Для вымывания отдельных классов фосфолипидов при хроматографировании на колонке с кремневой кислотой преимущественно применяют смесь хлороформ—метанол с возрастающим количеством метилового спирта (4:1, 3:2, 1:4). При этом элюируются фосфолипиды в следующей последовательности: фосфатидилэтаноламины, фосфоинозитиды, фосфатидилхолины, сфингомиелины.

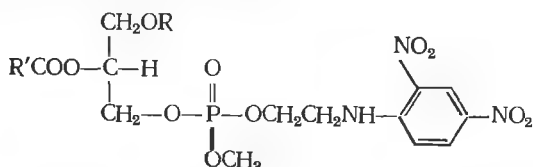
Выделенные липидные фракции очищают далее с помощью ТСХ на силикагеле в различных системах растворителей в зависимости от состава фосфолипидной смеси [7, р. 530]. Наиболее распространены следующие системы: хлороформ — метиловый спирт — уксусная кислота — вода (25:15:4:2, по объему), хлороформ — метиловый спирт — вода (65:25:4), хлороформ — метиловый спирт — 28%-ный аммиак (65:25:5) и т. д.

При проведении анализа с помощью ТСХ следует иметь в виду, что каждое пятно на хроматограмме представляет собой «семейство» родственных фосфолипидов, которые отличаются по длине цепи и степени

ненасыщенности входящих в их состав жирных кислот и могут быть в различных формах (диацильной, плазмалогенной или в форме алкил-ацилфосфатидов — алкильные фосфолипиды).

Для разделения фосфолипидов по степени ненасыщенности, а также для частичного разделения фосфолипидов с простой и сложной эфирными связями применяют ТСХ на силикагеле, импрегнированном AgNO_3 . Выделенные фосфолипиды далее пропускают через колонку с ионообменником (H^+ -форма) для удаления ионов серебра. Каждый подкласс (диацил-, алкилацил- и алкенилацил-формы) может быть подвергнут повторному разделению по степени ненасыщенности на силикагеле, импрегнированном AgNO_3 .

Для более резкого проявления различий в хроматографической подвижности диацильных и алкильных фосфолипидов и плазмалогенов (см. стр. 265) используют их менее полярные производные. Так, фосфатидилэтаноламины с простой и сложной эфирными связями и фосфатидальэтаноламины (см. стр. 295) были разделены с помощью многократной одномерной хроматографии на силикагеле в виде метилированных динитрофенильных производных



Аналогично диацил-, алкилацил- и алкенилацилфосфолипиды разделяли в тонком слое силикагеля в виде диметилвых эфиров соответствующих фосфатидовых кислот, получаемых последовательной обработкой фосфолипидов фосфолипазой *D* и диазметаном.

Для разделения фосфолипидов по степени ненасыщенности применяют также хроматографию на колонках с алкилированными декстранами (сефадексами), используя органические растворители. В частности, таким методом проведено разделение фосфатидилхолинов в виде аддуктов с ацетатом ртути по степени ненасыщенности их жирнокислотных остатков.

Удобным методом разделения природных фосфолипидов по молекулярной массе и степени ненасыщенности является обращенно-фазовая распределительная хроматография в тонком слое гидрофобного силикагеля (импрегнирование ундеканом, тетрадеканом, силиконом). Метод эффективен и для разделения диметилвых эфиров фосфатидовых кислот.

Газо-жидкостная хроматография природных фосфолипидов осложнена их распадом в процессе хроматографии. Для структурного анализа фосфолипидов, как правило, проводят их ферментативный гидролиз до соответствующих диглицеридов, которые затем подвергают ГЖХ в виде ацетатов или силильных эфиров.

При выделении плазмалогенов приходится считаться с их высокой лабильностью; в частности, в условиях выделения возможно расщепление 1-алкенильноэфирной группы с образованием альдегидов, а также деацилирование в лизоплазмалогены, которые легко превращаются в циклические ацетали. Наибольшее число известных способов выделения и очистки плазмалогенов основано на методах селективного гидро-

лиза, при котором диацилфосфолипиды распадаются быстрее, чем плазмалогены. К таким методам относятся мягкий щелочной и ферментативный гидролиз (фосфолипазы).

СТРУКТУРНЫЕ КОМПОНЕНТЫ ЛИПИДОВ

ВЫСШИЕ ЖИРНЫЕ КИСЛОТЫ

Основными гидрофобными компонентами липидов являются высшие жирные кислоты, присутствующие в виде сложных эфиров или амидов. В настоящее время изучен жирнокислотный состав липидов различных классов и показано наличие разнообразных жирных кислот (более двухсот), отличающихся длиной цепи, числом и положением двойных связей, их конфигурацией, а также присутствием некоторых функциональных групп (окси-, кето-, эпокси- и т. д.).

Насыщенные жирные кислоты. Насыщенные кислоты природных липидов, как правило, имеют прямую неразветвленную цепь и содержат четное число атомов углерода. Кислоты с нечетным числом атомов углерода в незначительных количествах идентифицированы в ряде природных источников: молоко, кровь человека, жир волос человека и т. д. [8].

Основные насыщенные жирные кислоты $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n\text{COOH}$, входящие в состав природных липидов, представлены в табл. 12.

Т а б л и ц а 12. Насыщенные жирные кислоты, входящие в состав природных липидов

Кислота	<i>n</i>	Природный источник
<i>n</i> -Бутановая (масляная)	2	Сливочное масло
<i>n</i> -Гексановая (капроновая)	4	Пальмовое и кокосовое масла, жир молока
<i>n</i> -Октановая (каприловая)	6	Кокосовое и пальмовое масла, жир молока, масло некоторых семян
<i>n</i> -Декановая (каприновая)	8	Сливочное и кокосовое масла и др.
<i>n</i> -Додекановая (лауриновая)	10	Жир молока, кокосовое масло, масло семян лавра, пальмовое масло
<i>n</i> -Тетрадекановая (миристиновая)	12	Второстепенный компонент основных животных и растительных жиров; масло мускатного ореха и др.
<i>n</i> -Гексадекановая (пальмитиновая)	14	Основной компонент триглицеридов масел и животных жиров, а также фосфо- и гликолипидов различного происхождения
<i>n</i> -Октадекановая (стеариновая)	16	Обычно присутствует вместе с пальмитиновой кислотой; основной компонент некоторых растительных масел и многих животных жиров, фосфо- и гликолипидов различного происхождения
<i>n</i> -Эйкозановая (арахиновая)	18	Арахисовое масло, рыбий жир и др.
<i>n</i> -Докозановая (бегеновая)	20	Арахисовое, горчичное масла и др., мозг
<i>n</i> -Тетракозановая (лигноцериновая)	22	Арахисовое масло, основные природные жиры (в небольших количествах)
<i>n</i> -Гексакозановая	24	Пчелиный воск, воск льна, шерсти, мозг
<i>n</i> -Октакозановая	26	Основные воска
Триаконтановая (мелissoвая)	28	Пчелиный воск, различные растительные и минеральные воска

Природные высшие жирные кислоты обычно имеют прямую неразветвленную цепь. Кислоты, содержащие разветвления в цепи, являются второстепенными компонентами липидов животного происхождения и достаточно широко представлены в бактериальных липидах. Например, из воска туберкулезных бацилл выделены разветвленные насыщенные кислоты: 10-метилоктадекановая (туберкулостеариновая), 3,13,19-триметилтрикозановая и другие кислоты:



10-метилоктадекановая
кислота

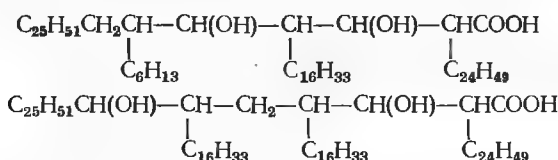


3,13,19-триметилтрикозановая
кислота

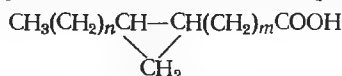
В ряде бактерий обнаружены кислоты общей формулы



Значительный интерес представляют миколовые кислоты — типичные составные части микобактерий. Миколовые кислоты штаммов *M. tuberculosis* (человека и быка) имеют соответственно формулы:

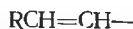


Достаточно широко представлены в различных бактериях и, в меньшей степени, в растениях кислоты — производные циклопропана. Например, в *E. Coli* обнаружены кислоты общей формулы

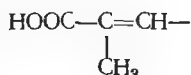


Ненасыщенные кислоты. В высших жирных кислотах обнаружены ненасыщенные связи различных типов (различные «типы ненасыщенности»):

Изолированная двойная связь (*цис*- и *транс*-)



2-Метилзамещенная двойная связь, сопряженная с карбоксильной группой



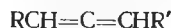
Двойные связи, разделенные метиленовой группой (метиленразделенные)



Конъюгированные двойные связи



Алленовые двойные связи



Ацетиленовые связи



В зависимости от числа присутствующих двойных связей полиненасыщенные кислоты подразделяют на моноеновые, диеновые, триеновые, тетраеновые и т. д., объединяемые под названием полиеновых жирных кислот.

Основными наиболее распространенными типами ненасыщенности, встречающимися в природных жирных кислотах, являются *цис*-изолированные двойные связи в случае моноеновых кислот и *цис*-метилен-

разделенные двойные связи в случае полиеновых кислот. Все ненасыщенные метиленразделенные жирные кислоты в зависимости от положения двойной связи по отношению к некарбоксильному концу делят на три типа: типы олеиновой, линолевой и линоленовой кислот (табл. 13).

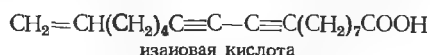
Т а б л и ц а 13. Природные ненасыщенные жирные кислоты

Кислота	Общее число атомов углерода	x	y	Природный источник
Тип олеиновой кислоты: $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_x(\text{CH}_2)_y\text{COOH}$				
Октадецен-9-овая (олеиновая)	18	1	6	Основные жиры и масла
Докозен-13-овая (эруковая)	22	1	10	Масло семян горчицы
Тетракозен-15-овая (нервоновая)	24	1	12	Цереброзиды спинного мозга
Октадекадиен-6,9-овая	18	2	3	Жир сельди
Эйкозадиен-8,11-овая	20	2	5	Печень быка
Эйкозатриен-5,8,11-овая	20	3	2	Фосфолипиды мозга, печени
Докозадиен-10,13-овая	22	2	7	Жир сельди
Докозатриен-7,10,13-овая	22	3	4	Фосфолипиды мозга
Тип линолевой кислоты: $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_x(\text{CH}_2)_y\text{COOH}$				
Октадекадиен-9,12-овая (лино- левая)	18	2	6	Большинство растительных ма- сел, фосфолипиды животного организма
Октадекатриен-6,9,12-овая (γ-ли- ноленовая)	18	3	3	Растительные масла
Эйкозадиен-11,14-овая	20	2	8	Фосфолипиды печени быка
Эйкозатриен-8,11,14-овая	20	3	5	Фосфолипиды печени быка, гли- кофосфолипиды мозга
Эйкозатетраен-5,8,11,14-овая (арахидоновая)	20	4	2	Фосфолипиды печени, мозга, поджелудочной железы млеко- питающих
Докозатетраен-7,10,13,16-овая	22	4	4	Фосфолипиды печени быка
Докозапентаен-4,7,10,13,16-овая	22	5	1	Липиды мозга и надпочечной железы
Тетракозатетраен-9,12,15,18-овая	24	4	6	Липиды мозга
Тип линоленовой кислоты: $\text{CH}_3\text{CH}_2(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_x(\text{CH}_2)_y\text{COOH}$				
Октадекатриен-9,12,15-овая (ли- ноленовая)	18	3	6	Большинство растительных ма- сел, фосфолипиды животного организма
Октадекатетраен-6,9,12,15-овая	18	4	3	Жир сельди
Эйкозатетраен-8,11,14,17-овая	20	4	5	Фосфолипиды печени
Эйкозапентаен-5,8,11,14,17-овая	20	5	2	Жир печени акулы и быка
Докозагексаен-4,7,10,13,16, 19-овая	22	6	1	Фосфолипиды печени быка, мозга
Тетракозагексаен-4,8,12,15,18, 21-овая (низиновая)	24	6	3	Печень трески, жир сардин

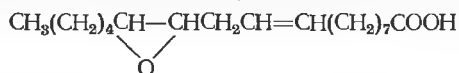
Наиболее распространенной является олеиновая кислота; содержа-
ние ее в оливковом масле составляет 85% (от общего содержания кис-
лот), в пальмоядровом масле — 74%, в других растительных маслах —
10—50%. Олеиновую кислоту выделяют из жира многих тепло- и хо-
лоднокровных животных, а также из липидов различных тканей и орга-

нов человека и животных. Линолевая (октадекадиен-9,12-овая) кислота является наиболее важной из диеновых кислот, найденных в растительных маслах. Многие масла (соевое, хлопковое, сафлоровое, маковое, подсолнечное, виноградное и др.) содержат более 50% линолевой кислоты, в животных жирах она присутствует в незначительных количествах. Линоленовая (октадекатриен-9,12,15-овая) кислота содержится в ряде растительных масел (льняное, конопляное и др.), животные жиры практически лишены линоленовой кислоты. Арахидоновая кислота — одна из наиболее интересных полиеновых кислот, так как обладает высокой биологической активностью. Основным источником арахидоновой кислоты являются фосфолипиды печени, мозга, почек, поджелудочной железы, мускулов, легких, лимфатических желез, жировых депо млекопитающих. Содержание ее в тканях животного организма 0,2—22 %.

Наряду с полиеновыми в природе встречаются и ацетиленовые кислоты. Значительный интерес представляют высшие ненасыщенные кислоты, содержащие одновременно двойные и тройные связи; многие из них обладают физиологической активностью, в частности, ксиминовая и изановая кислоты:



Из некоторых природных источников выделены эпоксикислоты, например 12,13-цис-эпоксиолеиновая (масло *Cephalocroton cordotanus*)

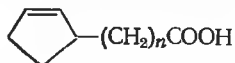


а также циклические кислоты, из которых наиболее интересны с точки

Т а б л и ц а 14. Основные природные окси- и кетокислоты

Кислота	Структурная формула	Природный источник
12-Оксиоктадецен-9-овая (рицинолевая)	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	Касторовое масло (90%), второстепенный компонент некоторых других масел
9-Оксиоктадецен-12-овая	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_2\text{CH}(\text{OH})(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	Масло семян <i>Strophanthus Sarmmentosus</i>
18-Оксилеостеариновая	$\text{HOCH}_2(\text{CH}_2)_3(\text{CH}=\text{CH})_3(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	Масло <i>Kamala</i>
9,10-Диоксистеариновая	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}(\text{OH})(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	Касторовое масло
2-Окситетракозановая (цереброновая)	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{21}\text{CH}(\text{OH})\text{COOH}$	Липиды мозга
2-Оксигеакозановая	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{23}\text{CH}(\text{OH})\text{COOH}$	Липиды мозга
2-Оксидокозановая	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{19}\text{CH}(\text{OH})\text{COOH}$	Липиды мозга
2-Окситетракозен-9-овая (оксинервоновая)	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{13}\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_6\text{CH}(\text{OH})\text{COOH}$	Липиды мозга
4-Кетоктадекатриен-9,11,13-овая (ликановая)	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_3(\text{CH}=\text{CH})_3(\text{CH}_2)_4\text{CO}(\text{CH}_2)_2\text{COOH}$	Масло семян <i>Coulpragrandiflora</i>

зрения физиологической активности 13-(циклопентен-2-ил)-тридекановая (хаульмуговая, $n=12$), выделенная из масла семян *Gynocardia adorata*, и 11-(циклопентен-2-ил)-ундекановая (гиднокарповая, $n=10$) кислоты:



Кроме того, из разнообразных природных источников выделены насыщенные и ненасыщенные окси- и кетокислоты (табл. 14).

Выделение высших жирных кислот

Для выделения высших жирных кислот и изучения жирнокислотного состава липидов используют различные методы. Как правило, вначале, используя методы кристаллизации, комплексообразования и другие, получают концентраты кислот, а окончательную очистку проводят с помощью методов хроматографии.

Метод низкотемпературной кристаллизации. Фракционирование жирных кислот, основанное на их различной растворимости, используется не только для разделения насыщенных и ненасыщенных соединений, но и во многих случаях для дальнейшего разделения смеси ненасыщенных жирных кислот. В ряду нормальных насыщенных и ненасыщенных кислот с одинаковым числом атомов углерода растворимость возрастает с увеличением степени ненасыщенности. *цис*-Формы, как правило, обладают большей растворимостью по сравнению с соответствующими *транс*- и *цис*, *транс*-изомерами. При проведении кристаллизации необходимо учитывать фактор взаимной растворимости кислот и возможность образования смешанных кристаллов.

Недостатками метода низкотемпературной кристаллизации являются большая продолжительность процесса вследствие медленного наступления равновесия в условиях низких температур, трудность полного отделения маточного раствора и осадка. Во многих случаях, особенно при выделении полиненасыщенных кислот, этот процесс используют как предварительную ступень очистки и разделения.

Разделение высших жирных кислот через комплексы с мочевиной. Одним из эффективных способов разделения служит получение кристаллических комплексов включения органических соединений с мочевиной или тиомочевиной, обычно называемых аддуктами или молекулярными соединениями. Комплексы включения, в частности комплексы с мочевиной, представляют собой молекулярные соединения, в которых один компонент содержится в решетке другого компонента.

Способность молекул жирных кислот образовывать комплексы с мочевиной была использована для выделения их из животных жиров и растительных масел [9]. Для получения наилучших результатов длина цепи разделяемых соединений должна различаться не менее чем на 4 атома углерода. Разделение кислот по степени ненасыщенности основано на том, что по мере увеличения степени ненасыщенности соединений с длинной цепью способность к комплексообразованию уменьшается, а растворимость комплексов увеличивается.

Разделение высших жирных кислот через бромпроизводные. Один из распространенных методов разделения полиненасыщенных кислот основан на переведении их в соответствующие бромпроизводные, обла-

дающие различной растворимостью в органических растворителях [10]. Кинетика процесса присоединения брома по двойным связям изучена достаточно полно; показано, что максимальные выходы бромпроизводных линолевой, линоленовой и других кислот достигаются при использовании в качестве растворителя петролейного или диэтилового эфиров и проведения реакции при $-40 \div -20^\circ\text{C}$. Регенерация кислот из бромпроизводных осуществляется с помощью дебромирования, которое приводит преимущественно к образованию *цис*-двойных связей.

Противоточное распределение. Этот метод применяют для фракционирования и анализа высших жирных кислот; эффективность его в значительной степени определяется выбором системы растворителей. Лучшие результаты получены при фракционировании метиловых эфиров жирных кислот. С помощью данного метода возможно разделение смеси кислот по длине цепи и степени ненасыщенности. Для разделения *цис*- и *транс*-изомеров осуществляют их распределение между метанольным раствором нитрата серебра и изеооктаном. Недостатком противоточного распределения является трудность разделения «критических пар» кислот.

Противоточное распределение применяется для количественного анализа моно-, ди-, три-, тетра-, пента- и гексаеновых кислот состава $\text{C}_{18}\text{—C}_{22}$; иногда данный метод используют в сочетании с другими физико-химическими методами анализа.

Хроматографические методы. В последнее время для выделения жирных кислот применяют различные виды хроматографии: адсорбционную и распределительную. Адсорбционная хроматография на кремневой кислоте, силикагеле и окиси алюминия используется как метод выделения и очистки ненасыщенных кислот, главным образом в виде эфиров. Для разделения кислот используют жидкостно-жидкостную распределительную хроматографию, причем лучшее разделение достигается при применении обращенно-фазовой системы [11].

Общим для всех распределительных хроматографических процессов является трудность разделения «критических пар». Частично эта проблема решается путем получения производных высших жирных кислот, в основном при помощи специфических реакций по двойным связям: бромирование, окисление, присоединение ацетата ртути и т. д.

Одним из известных методов качественного и количественного анализа высших жирных кислот является обращенно-фазовая распределительная хроматография на бумаге. Необходимая для этого метода гидрофобизация бумаги осуществляется пропитыванием ее силиконовым и парафиновым маслом, раствором алюмокалиевых квасцов и другими гидрофобными агентами. Для идентификации кислот на хроматограмме используют их реакции по карбоксильной группе (образование окрашенных солей с металлами, изменение окраски индикаторов) и реакции присоединения и окисления по двойным связям. Количественный анализ кислот проводят фотометрированием пятен с помощью денситометра или экстракцией отдельных пятен различными растворителями и последующим количественным определением кислот в полученных элюатах обычными методами (титрование и т. д.). При хроматографировании на бумаге в обращенно-фазовой системе возможно разделение насыщенных и ненасыщенных кислот, оксикислот, а также фракционирование полиеновых кислот с различной степенью ненасыщенности и длиной цепи. Метод применяется для количественного анализа кислот растительных масел и животных жиров.

Одним из наиболее эффективных методов анализа и разделения высших жирных кислот является распределительная хроматография в тонком слое силикагеля или кремневой кислоты. При этом достигается разделение кислот (в виде эфиров) по длине цепи и степени ненасыщенности [12, с. 140].

Наиболее эффективный метод разделения ненасыщенных кислот с помощью тонкослойной хроматографии основан на применении адсорбентов, пропитанных нитратом серебра. При этом возможно не только разделение по степени ненасыщенности, но и разделение позиционных и геометрических изомеров.

С помощью газо-жидкостной хроматографии метиловых эфиров жирных кислот осуществляют количественный и качественный анализ сложных смесей кислот, а также их препаративное разделение [11, 13]. Преимуществами данного способа являются быстрота осуществления анализа, четкость деления компонентов, возможность проведения большого числа анализов (100 и более) без регенерации фаз, высокая чувствительность метода (до 1%), возможность автоматического управления процессом, достаточная точность результатов. С помощью данного метода достигается разделение жирных кислот по длине цепи и степени ненасыщенности, возможно также разделение структурных и геометрических изомеров. Точный количественный анализ высших жирных кислот стал доступен вследствие совершенствования техники ГЖХ и с введением масс-спектрометрической идентификации выделенных компонентов.

В настоящее время этот метод является основным методом определения жирнокислотного состава отдельных классов липидов, выделенных из природных объектов. В ряде случаев используют сочетание методов тонкослойной хроматографии на силикагеле, пропитанном AgNO_3 , и газо-жидкостной хроматографии [13]. С помощью этого метода изучено распределение жирных кислот в отдельных органах и тканях животного организма, в отдельных элементах клетки (митохондрии, микросомы и т. д.) и других липидных системах. Он широко используется для изучения изменения жирнокислотного состава липидов при различных патологических состояниях организма.

Жирнокислотный состав липидов

Различия в жирнокислотном составе липидов растений, животных и бактерий в определенной степени обусловлены различиями путей биосинтеза высших жирных кислот в этих организмах.

Как известно, высшие растения синтезируют олеиновую, линолевую и линоленовую кислоты и обладают ферментами, способными осуществлять последовательное дегидрирование в цепи в направлении от карбоксильной группы к концевой метильной группе. Высшие животные способны синтезировать лишь олеиновую кислоту. Однако у животных имеются ферменты систем удлинения цепи и дегидрирования, благодаря чему возможно превращение линолевой и линоленовой кислот, поступивших с пищей, в полиеновые кислоты с более длинной цепью, например в арахидоновую, а также в кислоты состава $\text{C}_{22}:4$, $\text{C}_{22}:6^*$.

В бактериях осуществляется биосинтез кислот по двум механизмам:

- 1) окисление насыщенных жирных кислот с образованием олеиновой

* Первая цифра соответствует числу атомов углерода в цепи, вторая — числу двойных связей.

кислоты и 2) анаэробный путь — дегидрирование кислот с короткой цепью.

В фосфолипидах растительного происхождения преобладают ненасыщенные кислоты (50% и выше), из насыщенных кислот основной является пальмитиновая.

В фосфолипидах животных присутствуют значительные количества насыщенных кислот состава C_{12} — C_{26} , включая нечетные гомологи, из них основными являются стеариновая и пальмитиновая кислоты. Ненасыщенные кислоты представлены олеиновой, линолевой, линоленовой, пальмитиновой, арахидоновой и другими полиненасыщенными кислотами состава C_{22} — C_{24} [14].

Липиды грамположительных бактерий в качестве основных структурных элементов, как правило, содержат разветвленные кислоты, а липиды грамотрицательных бактерий — в основном насыщенные кислоты с прямой цепью и мононенасыщенные. Полиненасыщенные кислоты в липидах бактериального происхождения отсутствуют.

При сравнении жирнокислотного состава нейтральных липидов и фосфолипидов животных тканей следует отметить более высокое содержание пальмитиновой кислоты в нейтральных липидах, в то время как фосфолипиды богаче стеариновой кислотой.

Содержание олеиновой кислоты в триглицеридах выше, чем в фосфолипидах.

Кислоты типа линоленовой кислоты более характерны для фосфолипидов морских организмов, а кислоты типа линолевой — для наземных животных. У млекопитающих содержание арахидоновой кислоты в фосфолипидах выше, чем в триглицеридах [15].

Фосфолипиды животных проявляют определенную тканевую специфичность в отношении жирнокислотного состава, т. е. фосфолипиды гомологичных тканей различных животных обнаруживают большее сходство по характеру жирнокислотных компонентов, нежели фосфолипиды различных органов одного и того же животного.

В различных органах и тканях животных наблюдаются качественные и количественные различия в жирнокислотном составе липидов. Например, для липидов мозга характерно высокое содержание полиненасыщенных кислот $C_{20:4}$, $C_{22:4}$, $C_{22:5}$, $C_{22:6}$ и других.

Сравнение жирнокислотного состава отдельных классов фосфолипидов позволило выявить определенные закономерности [15]. Например, в фосфатидилэтаноламинах (см. стр. 282) из насыщенных кислот преобладает стеариновая, а в фосфатидилхолинах (см. стр. 280) — пальмитиновая кислота. Содержание полиеновых кислот состава C_{20} в фосфатидилэтаноламинах выше, чем в фосфатидилхолинах. В инозитфосфатидах содержится большое количество стеариновой кислоты (50—80%), в кардиолипине (см. стр. 292) — линолевой кислоты (60—70%).

В сфингомиелинах (см. стр. 338) основными жирными кислотами являются пальмитиновая, стеариновая, лигноцериновая, цереброновая, нервоновая, моноеновые кислоты состава C_{22} — C_{26} и диеновые кислоты состава C_{24} — C_{26} . В сфингомиелинах животных тканей преобладают насыщенные кислоты. Так, в сфингомиелинах мозга основные кислоты — стеариновая, нервоновая, лигноцериновая.

Цереброзиды (см. стр. 342) характеризуются большим разнообразием жирных кислот, отличающихся длиной цепи (C_{16} — C_{26}), степенью ненасыщенности и наличием оксигрупп. Цереброзиды мозга содержат кислоты состава C_{24} : цереброновую, нервовую, оксинервовую, лигно-

цериновую, Δ^{15} - и Δ^{17} - α -окситетракозеновые кислоты, бегеновую, а также пальмитиновую и стеариновую кислоты.

Природа жирнокислотных остатков фосфолипидов мембран является одним из важных факторов регулирования проницаемости биомембран, так как они влияют на поверхностные свойства фосфолипидов, липид-белковое и липид-липидное взаимодействие; природа жирнокислотных компонентов имеет существенное значение для действия липолитических ферментов и т. д.

Свойства высших жирных кислот

Строение кристаллов высших жирных кислот с нормальной цепью было изучено с помощью рентгеноструктурного анализа. Исследования на монокристаллах показали, что в полностью насыщенной углеводородной цепи атомы углерода находятся на равных расстояниях друг от друга (0,154 нм) и укладываются в два параллельных ряда. Отрезки, соединяющие соседние атомы, образуют зигзагообразную линию с одинаковыми зубцами. На этом основании был сделан вывод, что атомы углерода в цепи соединяются под тетраэдрическим углом $109^{\circ}28'$. В ходе дальнейших исследований было показано, что значения углов в действительности выше (110 — 114°). Подобная зигзагообразная конфигурация углеводородной цепи может рассматриваться как один из вариантов заторможенной конформации и является наиболее стабильной (рис. 19).

С помощью рентгеноструктурного анализа было установлено, что кристаллы высших жирных кислот обладают многослойной структурой. Так, стеариновая кислота имеет моноклинную ячейку, в которой укладываются 4 молекулы, ориентирующиеся сходными концами (CH_3 - и COOH -группы) друг к другу. В результате образуется бимолекулярный слой (рис. 20) [16, с. 224]. Рентгенограммы соединений с длинной цепью содержат две группы рефлексов: малоугловые рефлексy, соответствующие толщине повторяющегося слоя (большой период) и рефлексy под большими углами, характеризующие боковую упаковку молекул внутри слоя (малый период).

Большой период соответствует длине двух молекул, если цепи перпендикулярны плоскости слоя. Однако в случае стеариновой кислоты (рис. 21) оси длинноцепных молекул не перпендикулярны плоскости слоя, c -ось наклонена к плоскости под углом $\beta = 63^{\circ}38'$ и толщина слоя (d) определяется выражением:

$$d = c \sin \beta$$

Малый период практически идентичен для всех кислот. Большой период линейно зависит от числа атомов углерода в цепи жирной кислоты.

В ряду насыщенных жирных кислот наблюдается явление полиморфизма, обусловленное различным наклоном длинной оси молекулы к оси кристалла [17, pt. 1, p. 285; pt. 5, p. 3301]. Четные члены гомологического ряда насыщенных жирных кислот встречаются в двух или трех различных модификациях (A , B , C); для каждой из них характерна своя величина большого периода. Формы A и B образуются при кристаллизации из неполярных растворителей или при затвердевании расплава кислот, а C -форма — при кристаллизации из полярных растворителей. Наиболее устойчивой является C -форма. Полиморфные формы

характеризуются различным типом упаковки углеводородных цепей. Для формы А типична триклиническая упаковка, а для В- и С-форм — орторомбическая. Высшие жирные кислоты с нечетным числом атомов углерода также существуют в трех полиморфных формах (А', В', С').

Низшие кислоты растворимы в воде, с увеличением длины цепи растворимость уменьшается и кислоты состава C_{10} и выше практически не-

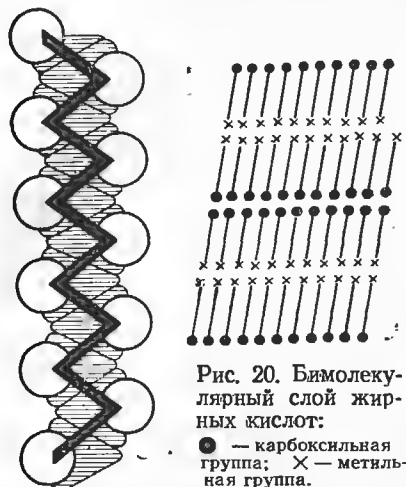


Рис. 19. Схематическое изображение зигзагообразной конформации углеводородной цепи.

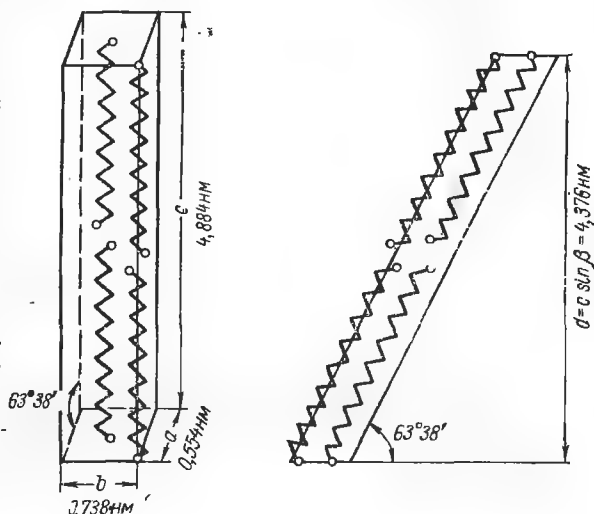


Рис. 21. Элементарная ячейка стеариновой кислоты.

растворимы. Высшие жирные кислоты образуют на поверхности воды мономолекулярную пленку, ориентированную гидрофильными группами ($COOH$) в сторону поверхности воды, а гидрофобными частями (углеводородные цепи) — в противоположную сторону, причем цепи перпендикулярны к поверхности воды [17, pt. V, p. 3419; 18]. Диссоциация высших жирных кислот в воде происходит в незначительной степени, так как они относятся к ряду слабых кислот ($pK \sim 5$).

Низшие жирные кислоты хорошо растворимы в спиртах, высшие — ограничено. Растворимость жирных кислот во всех органических растворителях возрастает с уменьшением длины цепи и увеличением степени ненасыщенности. *цис*-Изомеры обладают лучшей растворимостью по сравнению с соответствующими *транс*-формами.

В гомологическом ряду высших жирных кислот наблюдаются определенные закономерности в изменении физических свойств (т. пл., т. кип., растворимость, молярная теплоемкость и др.) [11, 19]. Так, температура плавления высших жирных кислот зависит от числа атомов углерода в цепи, степени ненасыщенности, положения и конфигурации двойной связи. Температура плавления, как правило, возрастает с увеличением длины цепи. Нечетные жирные кислоты плавятся при более низкой температуре, чем четные, содержащие на один атом углерода меньше. Изменение температуры плавления в ряду жирных кислот с четным и нечетным числом атомов углерода в цепи графически описывается двумя плавными кривыми (рис. 22).

Введение двойной связи в углеводородную цепь резко снижает температуру плавления. Положение двойной связи по отношению к карбоксильной группе и ее конфигурация оказывают значительное влияние на температуру плавления; температуры плавления *транс*-изомеров выше, чем у соответствующих *цис*-форм. Так, олеиновая кислота плавится при 14 °С, а элаидиновая (*транс*-изомер) — при 51,5 °С.

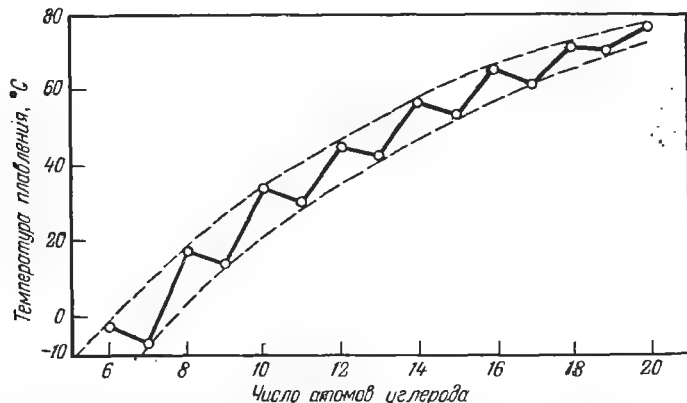
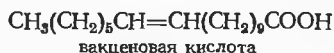
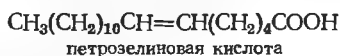
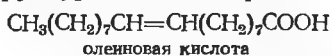


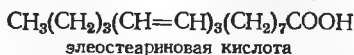
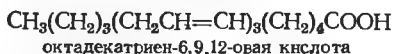
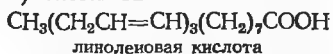
Рис. 22. Зависимость температуры плавления насыщенных жирных кислот от числа атомов углерода в молекуле.

Структурная изомерия. Изомерия положения двойной связи широко распространена среди ненасыщенных высших жирных кислот [17, рт. 5, р. 3287]. Так, моноеновые кислоты состава C_{18} представлены в природе тремя структурными изомерами:



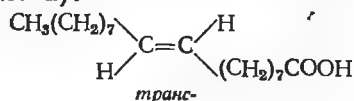
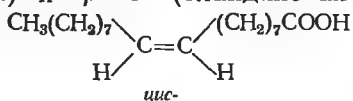
Диеновые кислоты C_{18} встречаются в виде двух изомеров: октадекадиен-9,12-овая (линолевая) и октадекадиен-6,9-овая кислоты.

Из природных источников выделены три изомера триеновых кислот C_{18} : линоленовая, элеостеариновая, октадекатриен-6,9,12-овая (γ -линоленовая) кислоты:

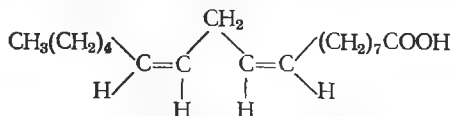


Моно-, ди-, три- и тетраеновые кислоты C_{16} существуют в природе в виде нескольких структурных изомеров, структурные изомеры известны и для кислот C_{20} , содержащих от двух до пяти двойных связей. Структурная изомерия пента- и гексаеновых кислот C_{22} и C_{24} изучена еще недостаточно.

Пространственная изомерия. Геометрическая (*цис-транс*) изомерия. Для октадецен-9-овой кислоты известны два изомера: *цис*- (олеиновая кислота) и *транс*- (элаидиновая кислота):



Для октадекадиен-9,12-овой кислоты теоретически возможно существование четырех изомеров: *цис,цис-*, *цис,транс-*, *транс,цис-* и *транс,транс-* октадекадиен-9,12-овые кислоты. Природной кислоте соответствует *цис,цис*-октадекадиен-9,12-овая кислота:



Из восьми возможных изомеров октадекатриен-9,12,15-овой кислоты известны два: *цис,цис,цис-* (линоленовая кислота) и *транс,транс,транс-* (линоленэлаидиновая кислота).

Природные кислоты, как правило, имеют *цис*-конфигурацию двойных связей.

Оптическая изомерия. Наличие прямой неразветвленной углеродной цепи у высших жирных кислот обуславливает отсутствие оптической изомерии в ряду данных соединений. Оптическая активность обнаружена у метил- (туберкулостеариновая) и оксизамещенных (диоксистеариновая, рицинолевая и др.) кислот, имеющих асимметрические атомы углерода. Циклические кислоты типа хаульмугровой и гиднокарповой выделены из масел в виде правовращающих форм.

Методы изучения структуры высших жирных кислот

При установлении строения высших кислот алифатического ряда используются как общие методы, применяемые для определения структуры органических соединений, так и некоторые специфические.

С помощью химических методов можно определить молекулярную формулу жирных кислот, тип и число функциональных групп, наличие, число и положение двойных или тройных связей.

Исчерпывающее гидрирование в присутствии палладиевого или платинового катализаторов [17, pt. 2, p. 1187]. Этот способ дает возможность, с одной стороны, получить известную насыщенную кислоту, с другой стороны, — определить число ненасыщенных связей (по количеству поглощенного в реакции водорода). Так, олеиновая, линолевая и линоленовая кислоты поглощают при гидрировании соответственно 1, 2 и 3 моль водорода и дают стеариновую кислоту; гидрирование ненасыщенных кислот состава C_{20} , C_{22} и C_{24} приводит соответственно к арахидовой, бегеновой и лигноцериновой кислотам.

Частичная информация о числе двойных связей может быть получена также из сопоставления скоростей гидрирования кислот различной степени ненасыщенности. Например, скорости гидрирования олеиновой, линолевой и линоленовой кислот относятся как 1 : 12 : 25.

Получение полибромпроизводных. При действии на моноеновые и полиеновые кислоты брома образуются устойчивые полибромнасыщенные кислоты, которые легко выделить в чистом виде. Полибромпроизводные *цис*-форм олефиновых кислот обычно получают в кристаллическом виде.

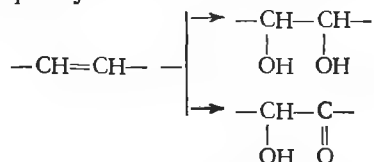
Проведение этого эксперимента (бромирование или иодирование) в строго контролируемых условиях дает точные данные о количестве поглощенного галогена, а следовательно, и о числе двойных связей в молекуле.

Таким путем были получены сведения о числе двойных связей в молекулах олеиновой, линолевой, линоленовой, арахионовой и других кислот.

Окислительное расщепление. В настоящее время с введением таких методов анализа высших жирных кислот, как газо-жидкостная и тонкослойная хроматография и другие, методы определения структуры ненасыщенных кислот, основанные на их расщеплении, имеют ограниченное применение. Использование их оправдано лишь для кислот с необычной структурой. Тем не менее, эти методы в ряде случаев являются отличным дополнением к физико-химическим.

Определение структуры ненасыщенных жирных кислот с помощью методов расщепления включает расщепление молекулы по месту двойных связей и идентификацию фрагментов.

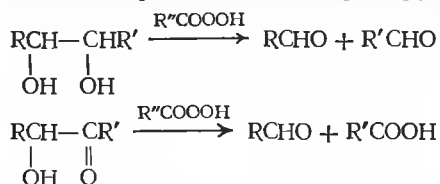
Окисление перманганатом калия. В зависимости от pH среды окисление перманганатом калия можно вести либо до образования полиоксикислот, либо до разрушения молекулы по двойным связям [20]. В щелочной среде ненасыщенные кислоты в зависимости от pH среды превращаются в полиоксикислоты или карбоновые кислоты, содержащие кетольную группировку:



При проведении реакций следует учитывать возможность изменения pH среды и, следовательно, направления реакции. Полученные полиоксикислоты могут быть подвергнуты дальнейшим превращениям.

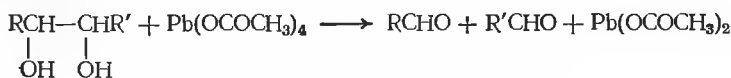
В нейтральных или кислых средах окисление перманганатом калия приводит к расщеплению двойной связи через стадию нейтрального циклического эфира с образованием моно- и дикарбоновых кислот.

Окисление надкислотами. Надкислоты применяют для окисления кислот, содержащих гликольную или кетольную группировку:



В качестве окислителей используют наддиоксидную, надуксусную, надбензойную и другие кислоты. При окислении надкислотами образуется ряд побочных соединений, затрудняющих идентификацию основных продуктов.

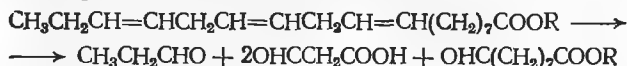
Для окисления α,β-гликольных группировок применяют также тетраацетат свинца



смесь азотной и серной кислот и другие окислители.

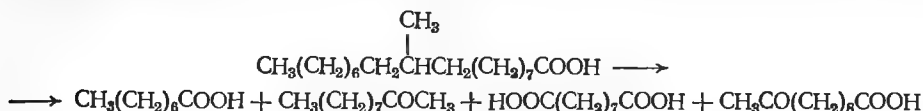
Озонирование. Озонирование широко используется для исследования строения ненасыщенных соединений, в частности полиненасыщенных

ных кислот. Так, из продуктов восстановительного озонирования эфира линоленовой кислоты выделены пропионовый альдегид, формилуксусная кислота и эфир 8-формилкаприловой кислоты:



Для исследования положения двойных связей в полиеновых кислотах используется, как правило, весь комплекс методов окисления.

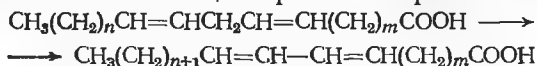
Для установления структуры разветвленных насыщенных кислот применяют окисление хромовой кислотой, которое сопровождается расщеплением молекулы по месту разветвления. Примером может служить окисление туберкулостеариновой кислоты:



В настоящее время методы окислительного расщепления кислот используются во многих случаях в сочетании с масс-спектроскопией и газожидкостной хроматографией для анализа полученных продуктов.

УФ-Спектроскопия. Метод нашел применение для исследования полиеновых и полииновых кислот и продуктов их щелочной изомеризации. УФ-Спектры дают характерные полосы поглощения лишь для конъюгированных систем: сопряженные двойные связи, сопряжение хромофоров (>C=O , $-\text{COO}^-$ и т. д.) с двойными связями и т. д.

В связи с этим для исследования метиленразделенных полиеновых кислот предварительно проводят их щелочную изомеризацию в сопряженные кислоты. В этом случае перемещение двойной связи, как правило, осуществляется в направлении карбоксильной группы (донорный эффект алкильного остатка и акцепторный — карбоксильной группы):



Полученные ненасыщенные кислоты имеют в УФ-спектре специфичные полосы поглощения (линолевая — 233 и 268 нм, линоленовая — 233, 268, 315 нм, арахионовая — 233, 268, 315, 346 нм), а также характерную интенсивность поглощения в указанных областях.

Инфракрасная спектроскопия. Инфракрасная спектроскопия имеет значительно большие возможности, по сравнению с ультрафиолетовой, для исследования высших жирных кислот. Она позволяет не только обнаружить специфические группы, но и дает возможность дифференцировать *цис*- и *транс*-изомеры, а также проследить влияние соседних групп и связей на поглощение COOH -группы и определить их положение в молекуле.

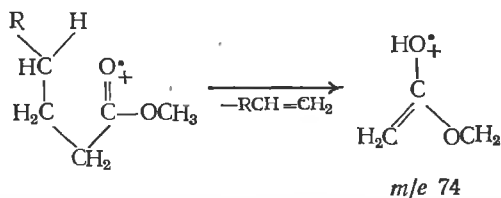
Снятие спектров кислот в твердом состоянии в виде кристаллических пленок позволяет определить длину цепи кислоты или ее эфира, осуществить дифференциацию полиморфных форм, определить положение двойных связей и т. д.

Различие, связанное с полиморфизмом, наблюдается в области 1695 см^{-1} , соответствующей колебаниям C=O -группы, и 1430 см^{-1} , обусловленное деформационными колебаниями метиленовых групп. В области $1350\text{—}1180\text{ см}^{-1}$ точное положение полос поглощения зависит от кристаллической формы.

Дублет при 714 и 725 см⁻¹ характеризует орторомбическую упаковку высших жирных кислот, а одиночная полоса при 719 см⁻¹ соответствует гексагональной или триклинической микроструктуре кристаллической ячейки.

Масс-спектрометрия. Этот метод применяется для определения структуры, качественной идентификации и количественного анализа жирных кислот [21]. Предварительно карбоновые кислоты переводят обычно в эфиры, значительно более летучие.

Основной ион, пик которого наблюдается в масс-спектрах метиловых эфиров карбоновых кислот с прямой цепью C₆—C₂₆, возникает благодаря разрыву β-связи по отношению к карбонильной группе с миграцией γ-атома водорода и образованием иона с *m/e* 74 по перегруппировке Мак-Лафферти:



Основные характерные пики, наблюдаемые в спектрах метиловых эфиров высших жирных кислот, обусловлены кислородсодержащими фрагментами, среди которых важная роль принадлежит ионам (M—31)⁺, отвечающим структуре R≡O⁺. Меньшую, но заметную интенсивность имеют пики ионов (COOCH₃)⁺ с *m/e* 59. Вероятно, что образуются также осколочные ионы [(CH₂)_nCOOCH₃]⁺, где *n*=2, 6, 10.

Масс-спектры метиловых эфиров олеиновой, линолевой и линоленовой кислот отличаются положением пиков, соответствующих «первоначальным» ионам с *m/e* 296, 294, 292.

Для анализа смесей кислот метод масс-спектрометрии особенно эффективен в сочетании с газо-жидкостной хроматографией.

Эффективным методом исследования высших жирных кислот является также ядерный магнитный резонанс, который позволяет определить тип ненасыщенности (олеиновая, конъюгированная, 1,4-диеновая), концевую ацетиленовую и олефиновую группы, конфигурацию двойной связи, разветвления в цепи, наличие циклопропанового и циклопропенового колец, дифференцировать окси-, эпокси-, эфирные группы, кетоны, енолы и т. д., а также исследовать полиморфные формы [22].

Синтез высших жирных кислот

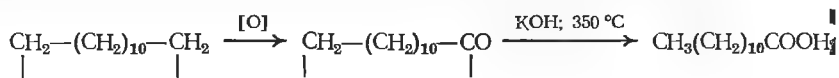
Направленному синтезу природных жирных кислот алифатического ряда в последнее время уделяется значительное внимание. Это обусловлено возрастающим объемом их промышленного использования и потребностью в ряде малодоступных природных кислот с целью изучения их биосинтеза и метаболизма.

Синтез насыщенных жирных кислот

Методы, используемые в синтезе насыщенных кислот, можно разделить на две группы: 1) без изменения длины углеродной цепи, 2) с удлинением углеродной цепи.

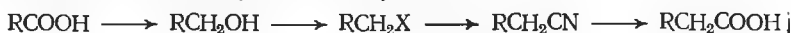
Первая группа методов включает химическую модификацию природных соединений, в частности окисление спиртов и альдегидов, гидрирование ненасыщенных кислот. Эти способы имеют ограниченное применение вследствие трудностей выделения чистых природных соединений. Хорошим примером является получение стеариновой кислоты гидрированием ненасыщенных кислот состава C_{18} [23].

Для получения смеси высших жирных кислот, используемых для промышленных целей, применяют жидкофазное окисление парафинов, катализируемое солями марганца или кобальта. Жидкофазное окисление циклопарафинов, получаемых олигомеризацией бутадиена и последующим каталитическим гидрированием циклоалкенов, приводит к соответствующим циклоалканам, при щелочном расщеплении которых образуются монокарбоновые кислоты с тем же числом атомов углерода. Аналогичным методом получена лауриновая кислота [24]:

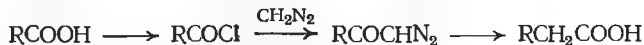


В синтезе жирных кислот насыщенного ряда используют многие классические методы удлинения цепи [25]:

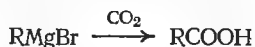
1) *Через стадию получения нитрилов:*



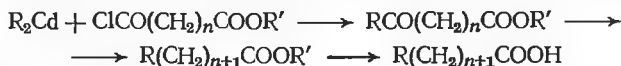
2) *С применением реакции Арндта—Эйстерта:*



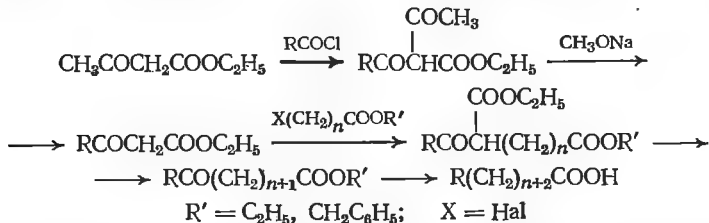
3) *Карбоксилирование реагентов Гриньяра:*



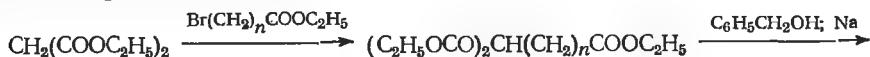
4) *Применение кадмий- или цинкорганических соединений.* При конденсации диалкилкадмия или диалкилцинка с галогенангидридами моноэфиров дикарбоновых кислот образуются кетокислоты, восстановление которых приводит к соответствующим насыщенным кислотам:

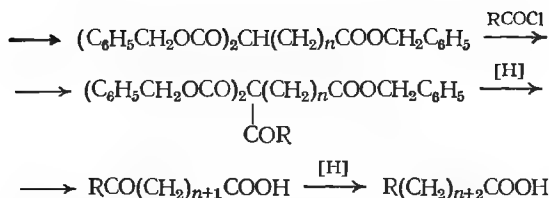


5) *Реакции конденсации с применением ацетоуксусного эфира* [23]:



6) *Реакции конденсации с применением малонового эфира.* Удлинение цепи жирной кислоты осуществляется в этом случае последовательной конденсацией малонового эфира с ω -бромэфирами и галогенангидридами жирных кислот:





Применение бензиловых эфиров более целесообразно в связи с возможностью удаления бензильных группировок каталитическим гидрированием в отличие от эфиров, включающих алкоксильные группы, которые могут быть удалены кислотным или щелочным гидролизом.

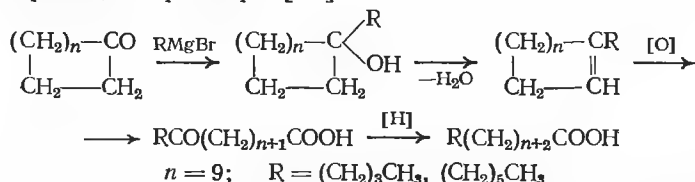
7) *Анодное окисление.* Анодное окисление смеси двух кислот является универсальным методом синтеза насыщенных кислот с прямой и разветвленной цепью:



Этим методом синтезированы кислоты с длиной цепи C_8 — C_{18} и выше.

8) *Реакция теломеризации.* Реакция теломеризации позволяет на основе доступного сырья (этилен и другие олефины и их галогенпроизводные, низшие спирты и др.) получать непосредственно или после простой химической переработки высшие моно- и бифункциональные соединения, в том числе карбоновые и дикарбоновые кислоты. Получаемые при теломеризации ω -галогензамещенные кислоты могут быть использованы для синтеза насыщенных и ненасыщенных кислот.

9) *На основе циклических соединений.* Насыщенные жирные кислоты состава C_{16} , C_{18} и другие могут быть получены из циклоалканонов с помощью реакции Гриньяра [26]:



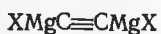
При взаимодействии алкилмагниибромидов с циклоалканонами образуются третичные спирты — 1-алкилциклоалканолы-1. Дегидратация этих спиртов приводит к 1-алкилциклоалкенам-1, окисление которых хромовым ангидридом и последующее восстановление образующихся при этом кетокислот дает соответствующие насыщенные кислоты.

Синтез ненасыщенных жирных кислот

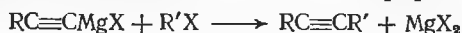
При синтезе ненасыщенных кислот необходимо учитывать их высокую химическую активность: чувствительность к действию кислорода, температуры, света, склонность к миграции двойных связей с образованием конъюгированных систем и т. д. Для получения ненасыщенных кислот алифатического ряда с *цис*-конфигурацией двойных связей необходимо выбирать методы, которые обеспечивают стереонаправленный синтез данных соединений.

Во многих синтезах полиеновых кислот с природной пространственной структурой используют ацетилен и его производные, так как стереоспецифическое восстановление тройной связи приводит к *цис*-олефинам.

Синтез ненасыщенных жирных кислот с помощью реакции Июича. Комплексы Июича, представляющие собой соединения типа



обладают высокой реакционной способностью, которая может быть объяснена электроноакцепторными свойствами ацетиленовой связи, обуславливающими поляризацию связи $\text{C}-\text{MgX}$. Реакция комплексов Июича с алкилгалогенидами используется для удлинения углеродной цепи с одновременным введением тройной связи, а также для непосредственного получения ацетиленовых кислот и их эфиров:

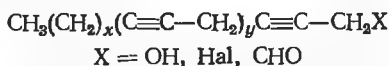


Конденсация проходит успешно лишь в случае аллильного ($=\text{CH}-\text{CH}_2\text{X}$) и пропаргильного ($\equiv\text{C}-\text{CH}_2\text{X}$) галогенов; для насыщенных алифатических галогенидов состава C_4 и C_5 реакция протекает с трудом, а для соединений состава C_8 практически не идет.

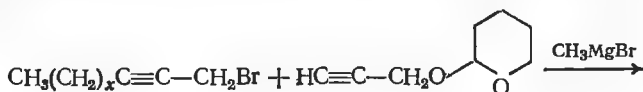
В некоторых случаях вместо алкилгалогенида применяют соединения типа ROSO_2CH_3 и R_2SO_4 и получают удовлетворительные выходы при $\text{R}=\text{C}_2\text{H}_5$, C_3H_7 , C_4H_9 , C_5H_{11} , C_6H_{13} . Установлено, что в реакциях конденсации с участием реактивов Июича и Гриньяра растворители образуют сложные комплексы с металлоорганическими соединениями. Необходимое для проведения реакции предварительное вытеснение связанного в комплексе растворителя определяется относительной электронодонорной способностью алкилгалогенида и растворителя. Конденсация комплексов Июича с алкилгалогенидами проходит удовлетворительно при большей электронодонорной способности алкилгалогенида и отсутствии пространственных затруднений. В присутствии солей одновалентной меди выход увеличивается. Механизм действия одновалентной меди как катализатора точно не установлен, но предполагают, что ионы меди либо образуют промежуточные реакционноспособные ацетилениды меди, либо вступают в координационную связь с галогеном, активируя связь $\text{C}-\text{X}$.

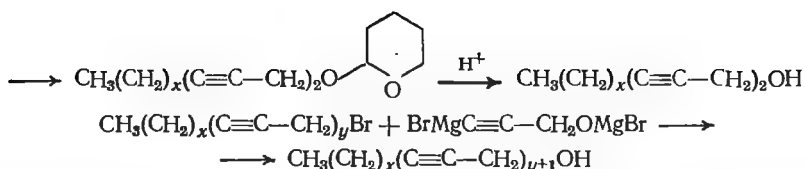
Реакции с комплексами Июича использованы в синтезах полиненасыщенных кислот алифатического ряда, таких, как линолевая, линоленовая, γ -линоленовая, арахидоновая, докозатетраен-7,10,13,16-овая и другие. При построении углеродной цепи жирных кислот с помощью комплексов Июича различают следующие этапы: 1) синтез метиленразделенных (т. е. 1,4-полииновых) соединений путем удлинения цепи на различные фрагменты, 2) введение карбоксильной группы, 3) селективное гидрирование с образованием 1,4-полиеновых систем.

Синтез 1,4-полииновых соединений. Синтез 1,4-полииновых соединений общей формулы

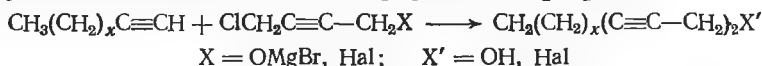


осуществляют различными способами. Наиболее распространенный метод удлинения углеродной цепи ацетиленовых углеводородов — присоединение трехуглеродного фрагмента, в качестве которого обычно используют тетрагидропиранильное (в синтезе арахидоновой кислоты) или димагнийбромпроизводные пропаргильного спирта [27]:

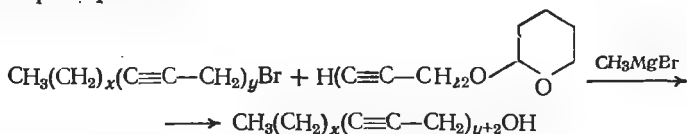




Для удлинения углеродной цепи ацетиленов на четыре атома углерода используют их реакции с магнийорганическим соединением 4-хлорбутин-2-ола-1 или с 1,4-дихлорбутином-2 [28]:

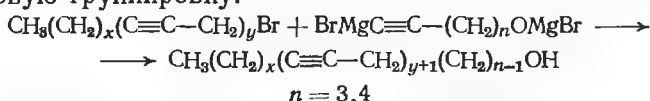


Присоединение шестиуглеродной единицы — 2-(гексадин-2,5-илокси)-тетрагидропирана

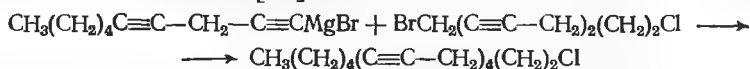


было использовано в синтезе арахиононовой и докозагексаен-4,7,10,13,16,19-овой кислот [28].

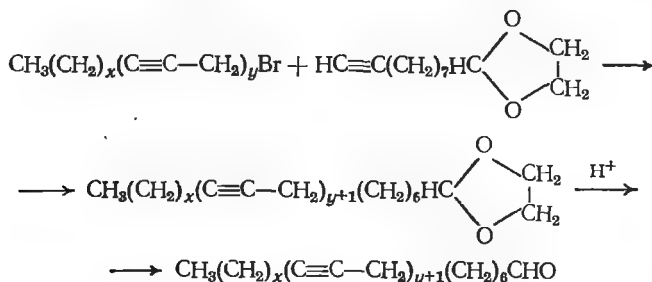
Присоединение более длинных фрагментов осуществляют конденсацией алкинов или их галогенпроизводных с реактивами Иодича, полученными из спиртов, хлоридов и циклических ацеталей, содержащих ω-ацетиленовую группировку:



Так, конденсация с хлоридами использована для удлинения цепи на одном из этапов синтеза арахиононовой [29], а также в классическом синтезе линолевой кислот [30]:



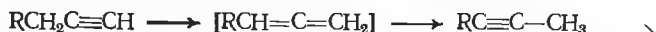
ω-Ацетиленовые ацетали использованы при построении 1,4-дииновой системы в синтезе линолевой ($x=4$, $y=1$) и линоленовой ($x=1$, $y=2$) кислот [31]:



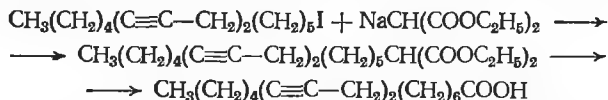
1,4-Полииновые углеводороды с концевой ацетиленовой связью, широко используемые при получении полиеновых кислот, обычно синтезируют конденсацией алкинов-1 с пропаргилбромидом [29]:



Однако при работе с полииновыми соединениями подобного типа необходимо учитывать их способность к реакциям полимеризации и изомеризации. В случае метиленразделенных полииновых углеводов с концевой тройной связью изомеризация идет в очень мягких условиях (например, в присутствии NaNH_2 при $-55 \div -60^\circ\text{C}$):

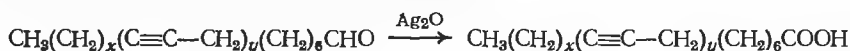


Введение карбоксильной группы. Переход от галогенпроизводных ацетиленовых углеводов к соответствующим кислотам может быть осуществлен конденсацией их с малоновым эфиром, что сопровождается удлинением цепи на два атома углерода. Такой способ введения карбоксильной группы использован, например, при получении линолевой кислоты [32]:

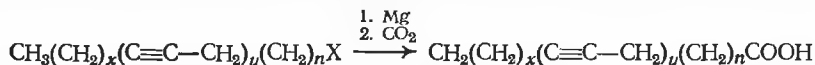


Основными недостатками этого метода являются проведение конденсации в щелочной среде и жесткий температурный режим декарбоксилирования, что может привести к изомеризации тройных связей.

Введение карбоксильной группы может также осуществлено окислением альдегидов окисью серебра



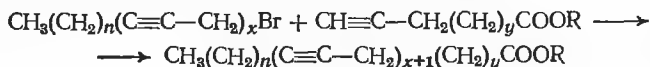
или карбоксилированием соединений Гриньяра. Этот способ применен в синтезах 1- ^{14}C -линолевой, линоленовой, арахидоновой и других кислот:



Аналогично осуществляется карбоксилирование и полиеновых систем [30].

Введение карбоксильной группы в галогеналкины или галогеналкены осуществляется через стадию получения нитрилов. Лучшие результаты были получены при использовании метансульфонатов в реакции с цианистым калием [29].

Наиболее часто для введения карбоксильной группы и одновременного удлинения цепи используют конденсацию ω -ацетиленовых кислот или эфиров с замещенными пропаргилбромидами:

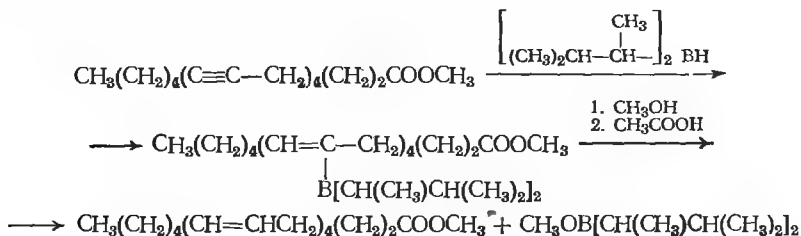


Реакция осуществляется в мягких условиях и с высокими выходами.

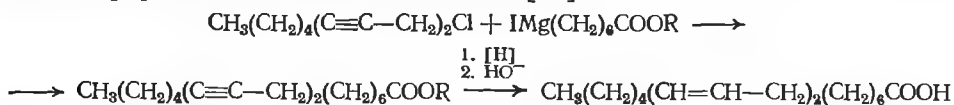
Этот принцип применен в синтезе линолевой ($n=4$, $x=1$, $y=6$) [27, 33], γ -линоленовой ($n=4$, $x=2$, $y=3$) [27], линоленовой ($n=1$, $x=2$, $y=6$) [34], арахидоновой ($n=4$, $x=3$, $y=2$) [27, 28, 31], докозатетраен-7,10,13,16-овой ($n=4$, $x=3$, $y=4$) [31], тетракозатетраен-9,12,15,18-овой ($n=4$, $x=3$, $y=6$) и других кислот.

Избирательное гидрирование 1,4-полииновых систем. Для избирательного и стереоселективного восстановления тройных связей в *цис*-этиленовые применяют катализатор Линдлара — Pd/CaCO_3 , отравлен-

ный солями свинца и хинолином, который нашел широкое применение в синтезе полиеновых кислот [35]. Для избирательного восстановления галогеналкинов в *цис*-галогеналкены в синтезе полиеновых кислот применяют диизобутилалюминийгидрид. Диизоамилборан селективно и стереоспецифично восстанавливает полииновые соединения в *цис*-полиеновые, например в синтезе арахидоновой кислоты [35]:



Синтез ненасыщенных кислот по методу Гриньяра—Вюрца. Этот метод основан на взаимодействии магнийорганических производных эфиров предельных карбоновых кислот с соединениями, содержащими пропаргильный галоген, и последующем гидрировании полученных при этом кислот. Так, например, линолевая кислота синтезирована реакцией 1-хлорундекадина-2,5 с магнийиодпроизводным, полученным из метилового эфира 7-иодгептановой кислоты [36]:



Этот способ синтеза линолевой кислоты имеет преимущества перед описанными ранее, поскольку он включает меньшее число стадий и идет с более высоким выходом (45%), чем при применении комплексов Июича (~15%).

Построение углеродной цепи с помощью магнийорганических производных ацетиленовых соединений с последующим избирательным гидрированием на одной из последних стадий является удобным методом синтеза полиеновых кислот с *цис*-конфигурацией двойных связей. Однако промежуточные ацетиленовые соединения очень лабильны и требуют специальных мер при выделении, очистке и хранении.

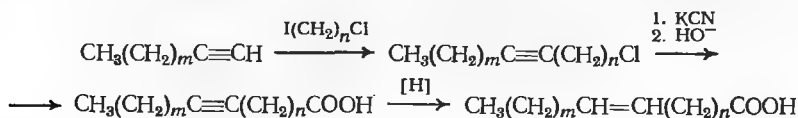
Построение углеродной цепи ненасыщенных кислот с помощью ацетиленидов металлов. Ацетилен и его монозамещенные при действии металлов образуют реакционноспособные соединения общей формулы



которые реагируют с алкилгалогенидами в более мягких условиях по сравнению с комплексами Июича. В синтезе полиеновых кислот преимущественно применяют натрий и литийпроизводные.

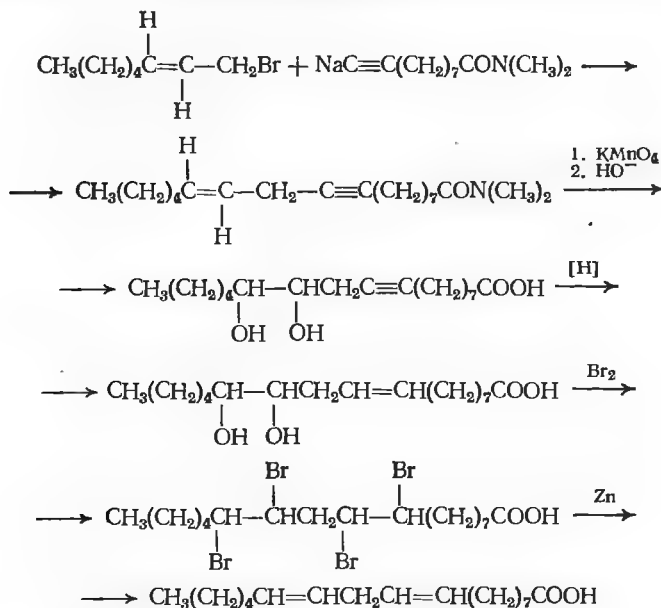
Однако этот метод имеет ряд ограничений. Так, галогеналкины нормального строения, содержащие более шести атомов углерода, с трудом реагируют с ацетиленидами металлов. Хлоралкины в этой реакции дают низкие выходы диалкилзамещенных ацетиленов. Вторичные, третичные, а также некоторые первичные алкилгалогениды изостроения в реакции с ацетиленидом натрия отщепляют галогеноводород. Кроме того, в условиях этой реакции ацетиленовые соединения могут подвергаться изомеризации при действии щелочных агентов. Поэтому, как правило, применение металлических производных ацетиленовых углеводов

ограничено синтезами моноеновых кислот, общий принцип построения углеродной цепи которых может быть представлен следующей схемой:



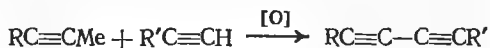
Конденсацией натриевых производных алкинов-1 с α -хлор- ω -иодалканами получают 1-хлоралкины, которые переводят в ацетиленовые кислоты через стадии цианирования и омыления. Частичное гидрирование этих кислот приводит к соответствующим *цис*-моноеновым кислотам. По аналогичной схеме получена олеиновая кислота ($m=n=7$) [37].

Значительное влияние на конденсацию алкилгалогенидов с натриевыми производными монозамещенных ацетиленов оказывает присутствие в их молекулах других реакционноспособных групп. Так, при наличии сложноэфирных групп наряду с основной конденсацией протекают побочные реакции ацетиленида натрия с карбонильным кислородом. Замена сложноэфирной группы на амидную резко повышает устойчивость карбонильного кислорода к действию ацетиленида натрия. Это было использовано в синтезе линолевой кислоты [38]. Для устранения возможности изомеризации при снятии замещенной амидной группировки щелочным гидролизом осуществляют предварительное гидроксילирование двойных связей. Синтез линолевой кислоты проведен по схеме:

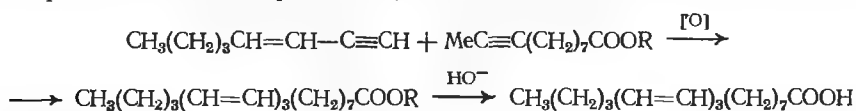


Конденсацией *транс*-1-бромоктена-2 с натрийпроизводным N,N-диметиламида децин-9-овой кислоты получают диметиламид *транс*-октадецин-9-ен-12-овой кислоты, который через стадии гидроксילирования и омыления превращают в *эритро*-12,13-диоксооктадецин-9-овую кислоту. Избирательное гидрирование этой кислоты и последующее бромирование приводят к *трео*-9,10,12,13-тетрабромоктадекановой кислоте, дебромирование которой дает линолеовую кислоту.

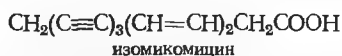
Получение ненасыщенных кислот окислительным сочетанием металлических и броммагневых производных алкинов-1. В синтезе полиацетиленовых соединений широко используется разработанный Глазером и Залкиндом метод удлинения углеродной цепи, основанный на окислительном сочетании ацетиленидов металлов и алкинов-1:



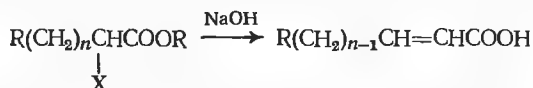
Окислителями в данной реакции служат хлориды и бромиды одно- и двухвалентной меди, красная кровяная соль, иод, кислород и др. Конденсация проходит с удовлетворительными результатами и при наличии в R и R' различных функциональных групп (COOH, COOR, OH, CO, CN), что позволяет использовать этот метод для получения ненасыщенных кислот с сопряженными системами двойных связей. Так, например, синтезирована октадекатриен-9,11,13-овая кислота:



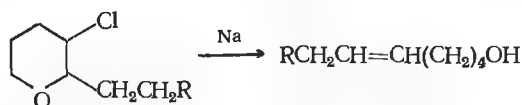
Методом окислительного сочетания получен ряд антибиотиков, например:



Синтез ацетиленовых и этиленовых соединений с помощью реакций элиминирования и расщепления гетероциклов. Ацетиленовые и этиленовые связи можно вводить с помощью реакций элюминирования: дегидрогалогенирования, дегалогенирования и др. Так, дегидрогалогенированием эфиров α -галогенкислот получают α,β -ненасыщенные кислоты:

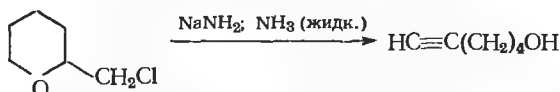


Для получения ненасыщенных кислот используют α -алкильные производные 3-хлортетрагидрофурана и 3-хлортетрагидропирана, которые при восстановительном расщеплении образуют ненасыщенные спирты алифатического ряда:



Переход от спиртов к соответствующим кислотам осуществляется либо через стадию окисления, либо омылением нитрилов [39].

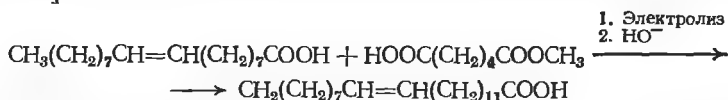
Расщепление α -замещенных тетрагидропиранов и α -замещенных фуранов используют также для получения спиртов с концевой тройной связью:



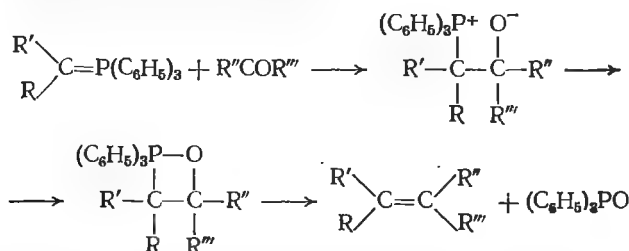
Синтез ненасыщенных кислот с помощью электролиза (метод Кольбе). По данному методу электролизу подвергают смесь моно- и дикарбоновой кислот. В случае синтеза ненасыщенных кислот необходимым

условием успешного протекания реакции является удаление двойной связи в исходных кислотах по крайней мере на два атома углерода от карбоксильной группы.

В синтезе эруковой кислоты совместному электролизу подвергают олеиновую кислоту и монометилвый эфир адипиновой кислоты [17, рт. 3, р. 1769]:

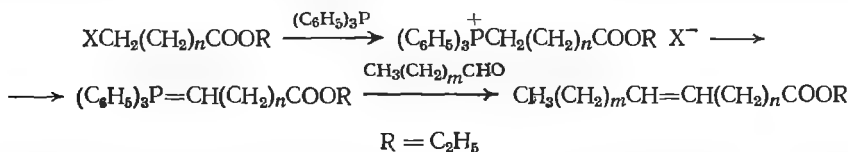


Синтез полиеновых кислот по реакции Виттига. Реакция Виттига нашла широкое применение в синтезе природных соединений и их аналогов [40]. Она заключается во взаимодействии карбонилсодержащих соединений с алкилидентрифенилфосфоранами и протекает через промежуточное циклическое соединение:



Реакция позволяет вводить двойную связь в строго определенное положение с одновременным удлинением углеродной цепи на звено желаемого строения. Варьируя заместители, можно получать соединения с различными функциональными группами и углеводородными остатками. Однако при реакции Виттига в классическом ее виде обычно образуется смесь стереоизомерных олефинов с преобладанием *транс*-формы. Выяснено, что на стереонаправленность реакции существенное влияние оказывает растворитель. Так, при осуществлении реакции в диметилформамиде или диметилсульфоксиде на холоду соотношение изомеров резко сдвигается в сторону *цис*-формы. Найдено, что и в бензоле реакция может быть проведена стереонаправленно (образование *цис*-формы) при добавлении аминов или галогенидов металлов [41].

По реакции Виттига конденсацией альдегидов с ω -карбэтоксидалкилидентрифенилфосфоранами получен ряд *цис*-изомеров ненасыщенных жирных кислот [42]:



Например, конденсацией пеларгонового альдегида ($m=7$) и ω -карбэтоксидоктилдентрифенилфосфорана ($n=7$) синтезирована олеиновая кислота с 95%-ным содержанием *цис*-изомера.

В заключение можно сказать, что в настоящее время синтезированы не все природные кислоты, однако разработаны методы, которые позволяют осуществить синтез большинства из них.

ВЫСШИЕ ЖИРНЫЕ СПИРТЫ И АЛЬДЕГИДЫ

Наряду с жирными кислотами к числу гидрофобных компонентов липидов можно отнести также длинноцепные жирные спирты, которые входят в состав нейтральных и фосфорсодержащих липидов с простой эфирной связью (алкильные липиды), и альдегиды, входящие в состав плазмалогенов.

Для качественного и количественного анализа высших жирных спиртов, являющихся составной частью липидов, применяют различные методы. Большая часть из них основана на выделении алкиловых эфиров глицерина при помощи щелочного гидролиза или восстановления LiAlH_4 фракции нейтральных или сложных липидов и последующего разделения полученной смеси алкиловых и алкен-1-иловых эфиров глицерина либо тонкослойной хроматографией на силикагеле, пропитанном AgNO_3 , либо расщеплением алкен-1-иловых эфиров глицерина кислотным гидролизом.

Полученные алкиловые эфиры глицерина переводят в различные производные (изопропилиденовые, диацетаты, диметоксильные) и идентифицируют методом тонкослойной или, чаще, газо-жидкостной хроматографии. Периодатным окислением этих эфиров получают алкиловые эфиры гликолевого альдегида, а восстановлением иодистым водородом — алкилиодиды. Эти производные затем также подвергают газо-жидкостной хроматографии. Алкилиодиды восстановлением алюмогидридом лития можно перевести в алканы, а взаимодействием с ацетатом серебра — в ацетоксислуканы, которые далее подвергают анализу. Однако способ восстановления иодистым водородом непригоден для анализа ненасыщенных эфиров.

Используя совокупность указанных методов анализа, проведено исследование состава спиртовых компонентов в различных классах нейтральных и сложных липидов алкильного типа, выделенных из различных природных источников. Показано, что в образовании простой эфирной связи с глицерином принимают участие главным образом спирты с четным числом атомов углерода и неразветвленной цепью, как насыщенные, так и ненасыщенные. Основными представителями этих спиртов являются гексадециловый, октадециловый и октадецен-9-ол-1 (олеиновый) спирты. В составе алкильных липидов обнаружены также спирты с длиной цепи C_4 — C_{22} , в том числе спирты с нечетным числом атомов углерода, разветвленные и полиеновые спирты.

При изучении альдегидного состава плазмалогенов обычно проводят расщепление плазмалогенов по винильноэфирной группе с освобождением альдегидов. Разработаны способы специфического гидролиза 90 %-ной уксусной кислотой, трихлоруксусной кислотой, солями ртути и других тяжелых металлов.

Первые способы количественного определения альдегидов были основаны на получении различных кристаллических производных. Однако в последнее время для определения альдегидного состава плазмалогенов используют почти исключительно газо-жидкостную хроматографию. Чаще всего исследуют смеси диметилацеталей, однако при этом следует считаться с возможностью отщепления спирта с образованием алкенилалкиловых эфиров. Более удобны для анализа альдегидов с помощью ГЖХ циклические ацетали с этиленгликолем или триметиленгликолем. В ряде случаев модифицируют альдегиды до спиртов, которые хроматографируют в виде ацетатов, или до кислот, анализируемых в

виде метиловых эфиров. В последнее время показана возможность анализа этим методом и свободных длинноцепных альдегидов.

Все эти методы позволили установить, что основные альдегидные компоненты плазмалогенов обычно содержат углеродную цепь из 16 или 18 углеродных атомов, насыщенную или мононенасыщенную ($C_{18:1}$) [43]. Значительно более редко присутствуют альдегиды состава C_{12} — C_{17} , а также разветвленные насыщенные альдегиды, хотя в некоторых тканях содержание их довольно значительно. Так, *n*-тетрадеканаль, например, составляет 14% суммарного содержания альдегидов в мышцах лошади, 16—23% альдегидов сердечной мышцы крысы являются разветвленными, богат короткоцепными и разветвленными альдегидами молочный жир. Альдегиды состава C_{20} и C_{21} встречаются редко, высшие гомологи не обнаружены. Кроме того, в плазмалогенах наблюдается высокое содержание ненасыщенных альдегидов, из которых наиболее распространен октадецен-9-аль (олеиновый альдегид) [44]. В менингиоме человека в составе лецитин-плазмалогенов обнаружены полиеновые альдегиды $C_{18:2}$ и $C_{20:4}$.

Состав минорных альдегидов довольно разнообразен. В некоторых источниках (сердце человека, сперма быка и барана и т. д.) вариации невелики, однако в липидах бычьей селезенки найдено более 20 различных альдегидов, а состав плазмалогенов морских организмов и микрорганализмов еще разнообразнее. Например, в *Clostridium butyricum* обнаружены уникальные альдегиды, содержащие циклопропановое кольцо.

ПОЛИОЛЫ

Многообразие липидов в значительной степени определяется наличием в их составе различных полиспиртов (глицерин, различные диолы, миоинозит, моносахариды).

Глицерин. Наиболее типичным и самым распространенным полиолом в составе липидов всех классов является глицерин. Обнаружение глицерина в липидном гидролизате достигается с помощью бумажной и тонкослойной хроматографии, а отделение от других полиолов — с помощью адсорбционной хроматографии. Для идентификации получают производные глицерина, например трибензоат. Количественное определение глицерина проводят различными методами, например периодатным окислением с количественным определением выделяющегося при этом формальдегида. Широкое развитие получил метод ГЖХ летучих производных глицерина (ацетаты, силиловые эфиры).

В биологических источниках (растительных, животных и бактериальных) в составе нейтральных и фосфорсодержащих липидов обнаружены различные низшие спирты — этиленгликоль, 1,2- и 1,3-пропандиолы, 1,2-, 1,4-, 2,3- и 2,4-бутандиолы. Для выделения их использовали газо-жидкостную хроматографию (в виде ацетатов и триметилсилиловых эфиров), а идентификацию осуществляли с помощью масс-спектрометрии.

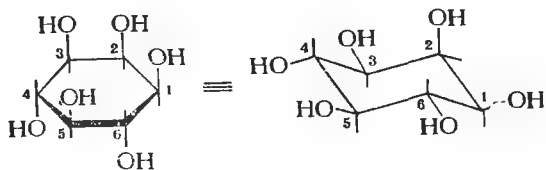
Миоинозит. Миоинозит является оптически неактивной формой шестиатомного циклического спирта — гексаоксициклогексана (известен также под названием мезоинозит или *i*-инозит).

Миоинозит присутствует в растительных и животных тканях в основном как структурный компонент липидов, лишь частично он обнаружен в свободном состоянии (например, в хрусталике глаза животных

и т. п.), в виде гексафосфата (фитин) или О-метильных эфиров (секвойтол, борнезит и т. д.).

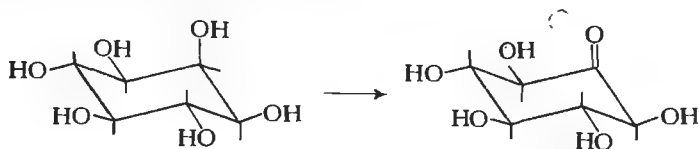
Для получения миоинозита инозитсодержащие липиды подвергают гидролизу; выделяют его с помощью ионообменной хроматографии, а идентифицируют — бумажной хроматографией.

Предпочтительной конформацией для миоинозита является конформация кресла:



В молекуле миоинозита гидроксильные группы в положениях 1, 3, 4, 5 и 6 являются экваториальными, а гидроксил в положении 2 имеет аксиальную конфигурацию, причем экваториальные гидроксильные группы у C_1 , C_3 и C_5 и аксиальный гидроксил у C_2 расположены по одну сторону плоскости кольца (*цис*-ориентация). Подтверждением *цис*-ориентации гидроксильных групп у C_1 и C_2 служит образование 1,2-изопропилиденмиоинозита, поскольку vicинальные *цис*-(но не *транс*)-оксигруппы реагируют с образованием 1,3-диоксоланов.

Для доказательства аксиального расположения гидроксильной группы у C_2 была использована высокостереоспецифичная реакция дегидрирования циклитов, осуществляемая ферментативно с помощью культур *Acetobacter syboxydans* и *Aerobacter aerogenes* или под действием кислорода в присутствии платинового катализатора. Оба процесса затрагивают лишь аксиальные гидроксильные группы. Миоинозит при этом превращается в сциллоинозозу:



Миоинозит оптически неактивен в связи с наличием плоскости симметрии, проходящей через положения 2,5, и представляет собой *мезо*-форму, однако асимметрично замещенные производные миоинозита обладают оптической активностью.

В настоящее время разработаны разнообразные химические, микробиологические и ферментативные методы количественного определения миоинозита.

Микробиологический метод основан на способности миоинозита промотировать рост отдельных микроорганизмов и дрожжевых грибов. Известен специфический ферментативный путь определения миоинозита, основанный на его окислении в глюкуроновую кислоту с помощью ферментной системы почек. Ферментативные и микробиологические методы являются достаточно точными и специфичными, но, к сожалению, связаны с такими трудоемкими процессами, как очистка фермента, выращивание микроорганизмов и т. д.

Химический метод количественного определения миоинозита основан на его окислении периодатом натрия и последующем колориметриче-

ском или спектрофотометрическом определении избытка окисляющего агента. Необходимым условием данного метода является отсутствие таких соединений, как глицерин, этаноламин, сахара и т. д., которые также окисляются периодатом.

УГЛЕВОДЫ

В составе гликолипидов обнаружены представители всех основных классов моносахаридов: гексозы, аминосахара, дезоксисахара, уроновые кислоты и т. д.

Углеводный состав гликолипидов определяется в значительной мере природным источником. Так, гликолипиды животного и растительного происхождения характеризуются большей упорядоченностью углеводного состава, чем гликолипиды бактериального происхождения, для которых наблюдаются значительные вариации в наборе углеводов. Наиболее часто встречающиеся в составе гликолипидов углеводы представлены в табл. 15.

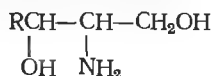
Таблица 15. Типичные углеводные компоненты липидов

Моносахарид	Класс гликолипидов, содержащих данный моносахарид
<i>D</i> -Галактоза	Моно- и дигликозилдиглициды, сфингогликолипиды, некоторые растительные и бактериальные гликолипиды
<i>D</i> -Глюкоза	Фосфатидилглюкоза и другие бактериальные гликолипиды, сфингогликолипиды
<i>D</i> -Манноза	Маннофосфоинозитиды и другие бактериальные гликолипиды
<i>D</i> -Арабиноза } <i>D</i> -Фруктоза } <i>D</i> -Глюкозамин }	Гликолипиды кислотоустойчивых бактерий и растений
<i>N</i> -Ацетил- <i>D</i> -галактозамин <i>N</i> -Ацетилнейраминная (сиаловая) кислота } <i>D</i> -Глюкуроновая кислота } 6-Дезокси- <i>D</i> -глюкоза (хиновоза) 6-Дезокситадоза } <i>D</i> -Рамноза } 2-О-Метил- <i>D</i> -рамноза }	Фосфогликолипиды бактериального происхождения
	Сфингогликолипиды (ганглиозиды)
	Гликолипиды кислотоустойчивых бактерий
	Сульфолпиды
	Бактериальные гликолипиды

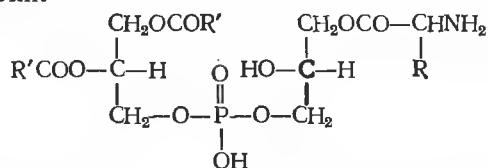
АМИНОСПИРТЫ И АМИНОКИСЛОТЫ

Многообразие природных фосфолипидов обусловлено присутствием в их молекулах разнообразных гидрофильных компонентов: аминоспиртов (этанолламин, *N*-ацилэтанолламин, *N*-метилэтанолламин, *N,N*-диметилэтанолламин, холин, β-метилхолин) и аминокислот (*L*-серин, *L*-треонин, *L*-аланин, *L*-лизин, *L*-орнитин). Эти компоненты, способные к ионному взаимодействию с белками, являются важнейшими структурными элементами мембран.

В составе сфинголипидов обнаружены также длинноцепные алифатические аминоспирты общей формулы



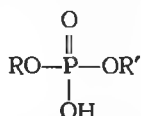
известные под названием сфинголипидных оснований. В настоящее время выделено свыше 50 сфинголипидных оснований. Аминокислоты обнаружены в составе так называемых липоаминокислот — О-эфиров аминокислот и фосфатидилглицерина, найденных в основном у грамположительных бактерий:



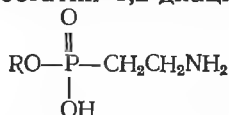
Аминокислотный состав липоаминокислот сильно зависит от вида микроорганизмов, причем, как правило, у каждого вида бактерий резко доминирует одна из аминокислот.

НЕОРГАНИЧЕСКИЕ КИСЛОТЫ

Большинство природных фосфолипидов является диэфирами фосфорной кислоты общей формулы



В последние годы доказано наличие в фосфолипидах производных фосфоновых кислот (R — остатки 1,2-диацилглицерина, церамида):



В составе сульфогликолипидов обнаружена сульфоновая кислота.

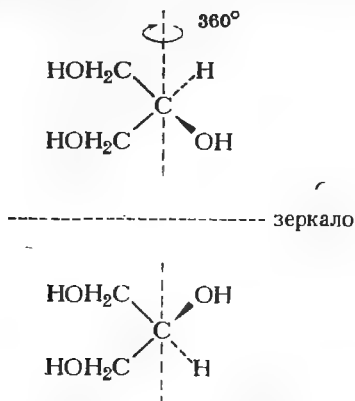
СТЕРЕОХИМИЯ И НОМЕНКЛАТУРА ЛИПИДОВ

Многообразие структуры природных липидов определяет наличие в них всевозможных видов изомерии. Широко представлена во всех классах липидов структурная изомерия, обусловленная различным положением заместителей в молекуле полиола или связанная с изомерией положения двойных связей или заместителей в присутствующих гидрофобных компонентах.

Ненасыщенные гидрофобные компоненты липидов (жирные кислоты, альдегиды, спирты, длинноцепные аминодиолы) обладают геометрической изомерией. Оптическая изомерия свойственна почти всем классам природных липидов. Для производных глицерина она обусловлена наличием асимметрического центра в глицериновой части молекулы, а в ряде случаев присутствием дополнительных асимметрических центров в остатках гидрофильных заместителей (аминокислоты, инозит, углеводы, замещенные производные глицерина и другие). В сфинголипиде наблюдается существование *эритро*- и *трео*-изомеров.

Особый интерес представляет рассмотрение стереохимических взаимоотношений в ряду производных глицерина. Как известно, молекула глицерина обладает элементами симметрии, а именно осью симметрии, и может быть совмещена со своим зеркальным изображением, что обу-

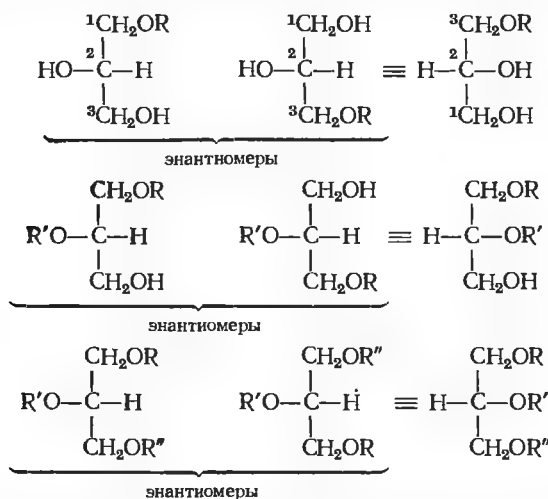
словливает отсутствие у нее оптической активности. Подобные молекулы называются недисимметричными, или ахиральными* (по старой терминологии — симметричными).



Атом C_2 в молекуле глицерина, связанный с двумя одинаковыми по химической природе заместителями ($-CH_2OH$), называется псевдоасимметрическим, или *мезо*-атомом.

У асимметрично замещенных производных глицерина исчезают элементы симметрии, и молекула становится дисимметричной, приобретает хиральность, т. е. способность существовать в виде энантиомеров. По современной терминологии подобные молекулы называют прохиральными [45, р. 108]. Таким образом, асимметричные моно-, ди- и тризамещенные производные глицерина содержат асимметрический центр (по современной терминологии, центр дисимметрии, или хиральный центр).

Оптически активные моно-, ди- и тризамещенные производные глицерина могут быть представлены следующими проекционными формулами**:



* Молекула дисимметрична, если она лишена элементов симметрии и не совмещается со своим зеркальным изображением, т. е. обладает хиральностью.

** На основании общего правила пользования проекционными формулами последние можно поворачивать в плоскости чертежа на 180° без изменения конфигурации.

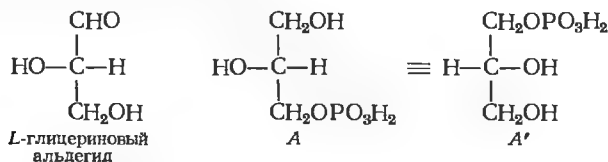
Симметричные дизамещенные производные глицерина обладают оптической активностью лишь в том случае, если R и R' — различные заместители. У триглицеридов (R, R' и R'' — ацилы) отмечается выраженное оптическое вращение лишь в том случае, если в положениях 1 и 3 присутствуют различные заместители (например, пальмитил, изобутирил, сорбитил и другие). У энантиомерных триглицеридов, которые содержат в положениях 1,3 остатки пальмитиновой, пальмитоолеиновой, олеиновой и других кислот, незначительно отличающихся друг от друга, оптическое вращение не обнаружено. Подобные глицериды, включающие остатки структурно родственных кислот в положениях 1 и 3, называются криптоактивными глицеридами. Отсутствие измеримой оптической активности у большинства природных масел и жиров, по-видимому, связано с наличием в их составе криптоактивных триглицеридов [46, с. 122].

Симметричные моно-, ди- и тризамещенные производные глицерина оптически неактивны.

При рассмотрении оптически активных производных глицерина следует обратить внимание на интересную деталь, связанную с тем, что введение одного и того же заместителя в положение 1 или 3 приводит к энантиомерам, т. е. эти положения не идентичны. Это обстоятельство в определенной мере повлияло на формирование номенклатуры оптически активных производных глицерина и способствовало появлению некоторой путаницы в этой области.

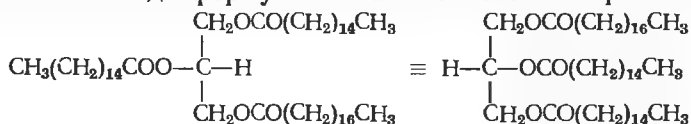
Для обозначения стереоизомеров замещенного глицерина предложены различные системы номенклатуры.

Согласно номенклатуре Байера и Фишера, α-монозамещенные производные глицерина должны быть отнесены к тому же ряду, что и глицериновый альдегид, в который они могут быть превращены без изменения или удаления заместителей. В соответствии с этим, например, глицерофосфорную кислоту (формула A) следует называть L-глицерин-α(или 3)-фосфатом:



Серьезное ограничение этой номенклатуры заключается в том, что ее нельзя использовать для обозначения энантиомеров триглицеридов, так как может возникнуть неопределенность, поскольку α-положение можно приписать как первому, так и третьему углеродным атомам глицерина.

Более удобна номенклатура, которая использует D/L индексы одновременно с цифровой нумерацией атомов углерода, причем углеродному атому с замещенной первичной гидроксильной группой присваивается низший номер (для α-монозамещенных). Согласно этой номенклатуре, глицерофосфорная кислота должна называться D-глицерин-1-фосфатом и изображаться в виде формулы A'. В этой системе триглицерид

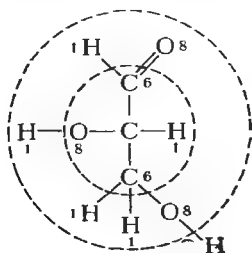


называют *L*-1,2-дипальмитоил-3-стеароилглицерином или *D*-2,3-дипальмитоил-1-стеароилглицерином.

Такое явление, когда в зависимости от применяемой номенклатуры меняется обозначение конфигурации, хотя изменения конфигурации при асимметрическом центре в действительности не происходит, называется формальной инверсией.

В номенклатуре *R/S* (система Кана — Инголда — Прелога) [1] стереохимические обозначения связываются непосредственно с пространственной моделью молекулы.

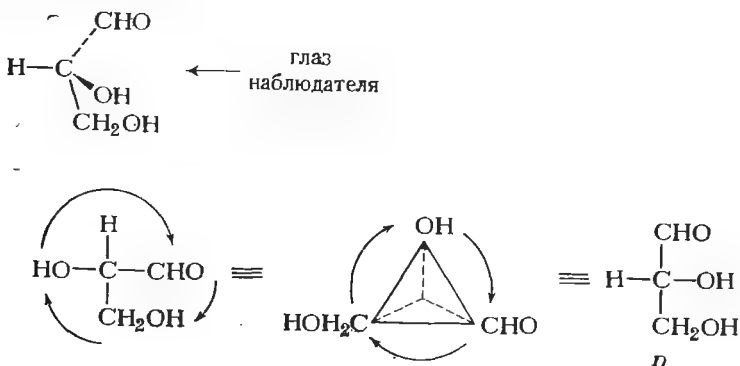
Согласно данной номенклатуре, заместители вокруг асимметрического центра размещают в порядке старшинства, которое определяется по атомным номерам элементов, входящих в состав заместителей. Например, в случае глицеринового альдегида определение старшинства заместителей производится следующим образом:



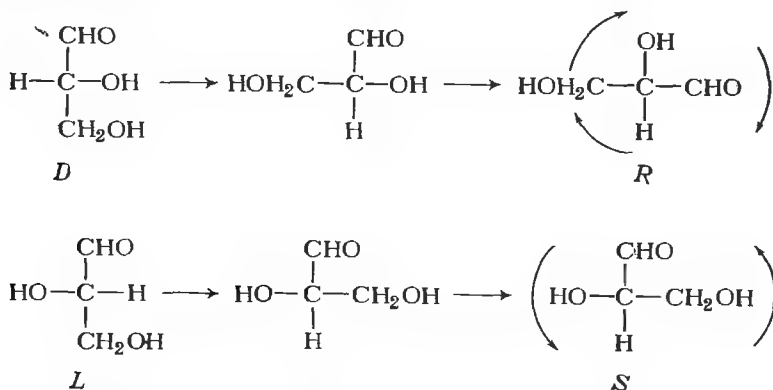
Атомные номера элементов первого слоя 8, 6, 6, 1. В группах СНО и CH_2OH атомы первого слоя одинаковы, и для решения вопроса о старшинстве этих групп привлекают атомы второго слоя. Согласно Кану, Прелогу и Инголду, связанные двойной связью атомы считают за два атома. Для атомов второго слоя сумма атомных номеров для СНО равна $8+8+1=17$, для CH_2OH — $8+1+1=10$. Таким образом, заместители в порядке уменьшающихся атомных номеров (убывающего старшинства) располагаются следующим образом:



Модель асимметрического атома строится так, что младший заместитель находится в удаленной от наблюдателя вершине тетраэдра, а остальные три заместителя располагаются в порядке убывания старшинства или по часовой (*R*-конфигурация), или против часовой стрелки (*S*-конфигурация):

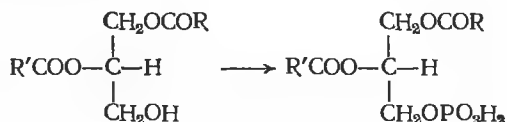


* Для определения конфигурации не только по модели, а с помощью проекционных формул Фишера авторами введено «правило конверсии». В соответствии с ним, для определения конфигурации по проекционной формуле Фишера необходимо с помощью четного числа перестановок, которое не меняет конфигурации, привести формулу к такому виду, чтобы младший заместитель занял нижнее положение; тогда порядок расположения заместителей по убывающему старшинству укажет *R*-или *S*-конфигурацию: *R* — по часовой стрелке, *S* — против часовой стрелки. Так, например, в случае энантиомерных глицериновых альдегидов нужно сделать две перестановки:

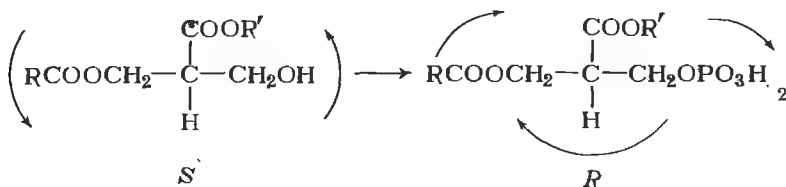


R/S-Система имеет универсальный характер и свободна от многих недостатков *D/L*-системы. Однако в применении к производным глицерина она не отражает многие важные структурные и биохимические взаимоотношения. Так, значительная часть химических и биохимических реакций в ряду производных глицерина включает образование и расщепление простых и сложных эфирных связей. Хотя эти превращения не затрагивают ни одну из четырех связей асимметрического атома при C_2 , однако при этом часто происходят изменения пространственных обозначений.

Например, фосфорилирование (*S*)-1,2-диацилглицерина приводит к *R*-фосфатидовой кислоте:



Изменение обозначений конфигурации в этом случае связано с изменением порядка старшинства заместителей при введении остатка фосфорной кислоты:



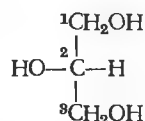
По системе Байера — Фишера аналогичное превращение также связано с изменением пространственных обозначений:



Приведенные системы обозначений (*R/S*, *D/L*) имеют еще целый ряд недостатков. Так, при действии фосфолипазы A_1 на оптически активный 1,3-диацилглицеро-2-фосфорилхолин отщепляется лишь одна ацильная группа в положении 1. Но такая стереоспецифичность не находит отражения в обозначении конфигурации ни в системе *D/L*, ни в системе *R/S*. В этих системах не отражается также неравноценность положений 1 и 3 в триацилглицеринах.

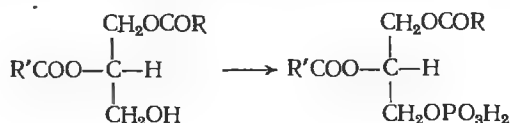
Использование разными авторами приведенных выше номенклатур в ряде случаев приводило к противоположным обозначениям конфигурации одних и тех же соединений.

С целью избежать недоразумений, связанных с применением различных номенклатур, в 1968 г. Комиссией по биохимической номенклатуре IUPAC — IUB были внесены предложения по новой универсальной номенклатуре липидов [47], основанной на стереоспецифической нумерации Хиршманна [48]. Согласно этой номенклатуре, использование которой обозначается символом *sn* (*stereospecific numbering*), если в фишеровской проекции гидроксильная группа расположена слева от C_2 , то углеродному атому, находящемуся над C_2 , присваивается номер 1, а нижнему — номер 3:



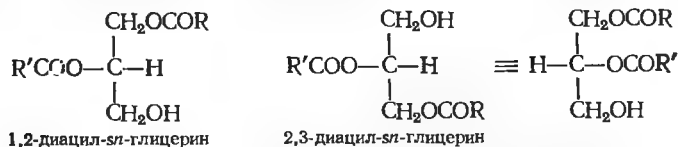
По данной номенклатуре, при любых превращениях, не приводящих к обращению конфигурации асимметрического центра, за каждым углеродным атомом глицеринового скелета сохраняется жесткая нумерация, что исключает возможность нескольких наименований для соединений с одной и той же конфигурацией (т. е. исключает формальную инверсию) и отражает неравноценность положений 1 и 3 при стереоспецифических реакциях.

В предлагаемой номенклатуре фосфорилирование 1,2-диацил-*sn*-глицерина (по номенклатуре Байера, *D*- α,β -диглицерид) приводит к 1,2-диацил-*sn*-глицеро-3-фосфату:

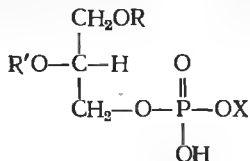


Недостаток стереоспецифической номенклатуры состоит в том, что она не выражает общепринятым способом (префиксы *D/L*, *R/S*) принадлежность к противоположным пространственным конфигурациям (оптическим антиподам). В данной системе это делается указанием места расположения заместителя у C_1 и C_3 . Например, *sn*-глицеро-3-фосфат и *sn*-глицеро-1-фосфат являются оптическими антиподами.

В аналогичном отношении находятся 1,2- и 2,3-диацил-*sn*-глицерины:



По системе «*sn*» все природные фосфоглицериды являются производными *sn*-глицеро-3-фосфата и имеют общую формулу



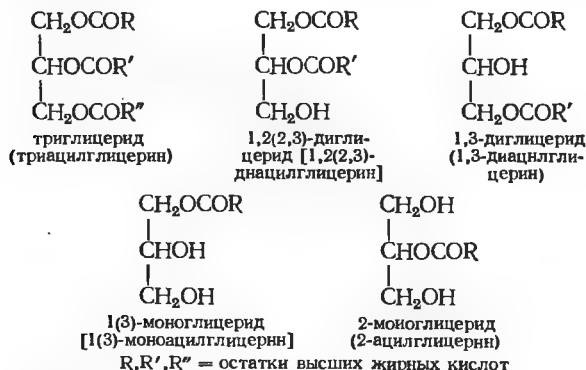
R = ацил, алкил, 1-алкенил; R' = ацил, алкил

В настоящее время данная номенклатура является наиболее удобной и используется исследователями, работающими в области химии липидов.

НЕЙТРАЛЬНЫЕ ЛИПИДЫ

ПРИРОДНЫЕ ГЛИЦЕРИДЫ

Глицериды — эфиры высших жирных кислот и глицерина — в зависимости от числа и положения жирнокислотных остатков подразделяют на следующие типы:



В природных источниках, как правило, присутствуют триглицериды, моно- и диглицериды обнаружены в незначительных количествах, и образование их может быть обусловлено ферментативным расщеплением триглицеридов. Широко используемые растительные масла и животные жиры представляют собой смеси триглицеридов различного типа с остатками насыщенных и ненасыщенных жирных кислот. В настоящее время установлено, что природные триглицериды состоят в основном из смешанных триглицеридов, «однокислотные» триглицериды входят в небольших количествах.

По степени ненасыщенности триглицериды делят на четыре типа: тринасыщенные (GS₃), мононасыщенные (GSU₂), динасыщенные

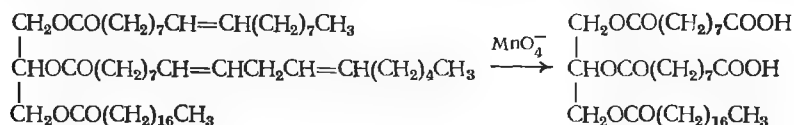
(GS₂U), ненасыщенные (GU₃), где G — остаток глицерина, S — остаток насыщенной кислоты, U — остаток ненасыщенной кислоты.

Характер распределения радикалов жирных кислот между триглицеридами, а также количественное соотношение триглицеридов разного состава являются основными вопросами при изучении их структуры [46, 49].

Методы установления строения глицеридов

Для изучения структуры триглицеридов, присутствующих в большинстве природных растительных масел и животных жиров, используют различные методы разделения их по длине цепи и степени ненасыщенности на отдельные классы с последующим изучением каждого класса с помощью химических и ферментативных превращений.

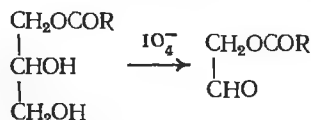
Окисление. Этот метод используют для определения типов триглицеридов, присутствующих в смеси глицеридов. Первой ступенью процесса является собственно окисление, осуществляемое действием перманганата калия в различных средах или смесью перманганата калия и периодной кислоты. При этом моно-, ди- или триненасыщенные триглицериды соответственно образуют глицериды с одним, двумя или тремя остатками дикарбоновых кислот, например:



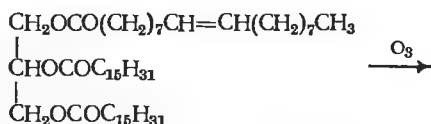
Второй этап состоит в отделении неизмененных тринасыщенных триглицеридов от образовавшихся глицеридов дикарбоновых кислот.

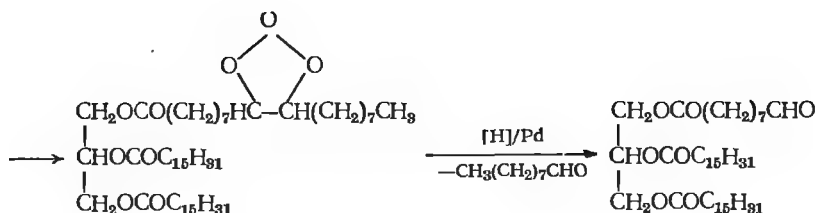
Разделение насыщенных глицеридов и продуктов окисления достигается хроматографией на кремневой кислоте или фракционированием солей глицеридов дикарбоновых кислот; наиболее эффективные результаты были получены методом противоточного распределения. Это позволило провести определение шести возможных типов глицеридов (GS₃, GUSS, GSUS, GUUS, GUSU, GU₃) в природных растительных маслах, животных жирах и различных биологических образцах.

Основным методом анализа 1-моноглицеридов является окисление их периодной кислотой, приводящее к образованию соответствующих эфиральдегидов:



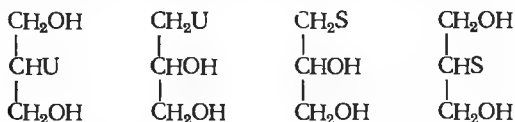
Озонирование. Для структурного анализа моно-, ди- и триглицеридов используют метод, основанный на озонировании глицеридов и последующем количественном восстановлении озонидов в соответствующие альдегиды, например:





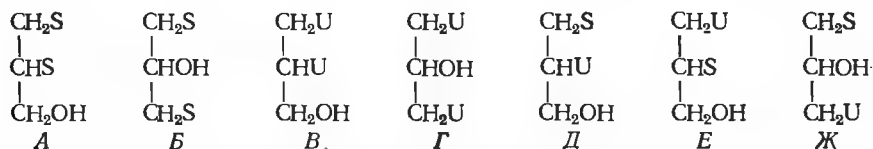
Количественное определение полученных эфиральдегидов проводят с помощью тонкослойной хроматографии в сочетании с денситометрическим методом.

Методом восстановительного озонирования в сочетании с окислением периодной кислотой можно определить, какие из четырех возможных типов моноглицеридов присутствуют в смеси:



Относительное содержание 1- и 2-моноглицеридов устанавливают окислением их периодной кислотой с последующим разделением полученных эфиральдегидов и 2-моноглицеридов с помощью тонкослойной хроматографии.

Методом восстановительного озонирования в сочетании с тонкослойной хроматографией можно провести определение шести типов диглицеридов из семи теоретически возможных (*Д* и *Е* — определяют суммарно):

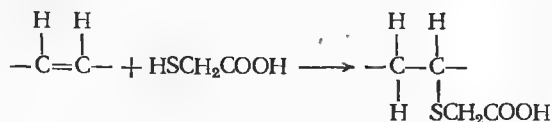


Озонированием этих диглицеридов и последующим восстановлением озонидов получают соединения с различной полярностью, что делает возможным их разделение тонкослойной хроматографией на кремневой кислоте. Ненасыщенные диглицериды *В* и *Г* дают после восстановительного озонирования наиболее полярные глицериды с альдегидными остатками, насыщенные диглицериды *А* и *Б* остаются неизменными и являются наименее полярными, смешанные диглицериды *Д*, *Е* и *Ж* занимают промежуточные положения. Разделение диглицеридов типа *Д* и *Е*, имеющих одинаковую полярность, невозможно, так как и после восстановительного озонирования они дают соединения одинаковой полярности.

Преимуществами описанного метода анализа ди-, моно- и триглицеридов являются простота осуществления, точность, хорошая сходимость результатов и возможность работы с микроколичествами веществ.

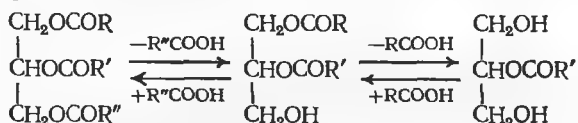
Реакции присоединения. Для определения насыщенных глицеридов в смеси с ненасыщенными используют метод, основанный на присоеди-

нении меркаптоуксусной кислоты к ненасыщенным жирнокислотным остаткам глицеридов:



Полученные глицериды отделяют от неизмененных насыщенных глицеридов экстракцией их аммониевых солей и ионообменной хроматографией.

Ферментативные методы. Одним из основных путей исследования структуры глицеридов в настоящее время является ферментативное расщепление, которое дает полную информацию о положении кислотных остатков в молекулах триглицеридов. Для этой цели используют панкреатическую липазу (ЕС 3.1.1.3), которая проявляет абсолютную специфичность в отношении первичных сложноэфирных групп триглицеридов. Гидролиз триглицеридов этим ферментом проходит ступенчато, через стадию диглицеридов, которые далее превращаются в 2-моноглицериды [50]:



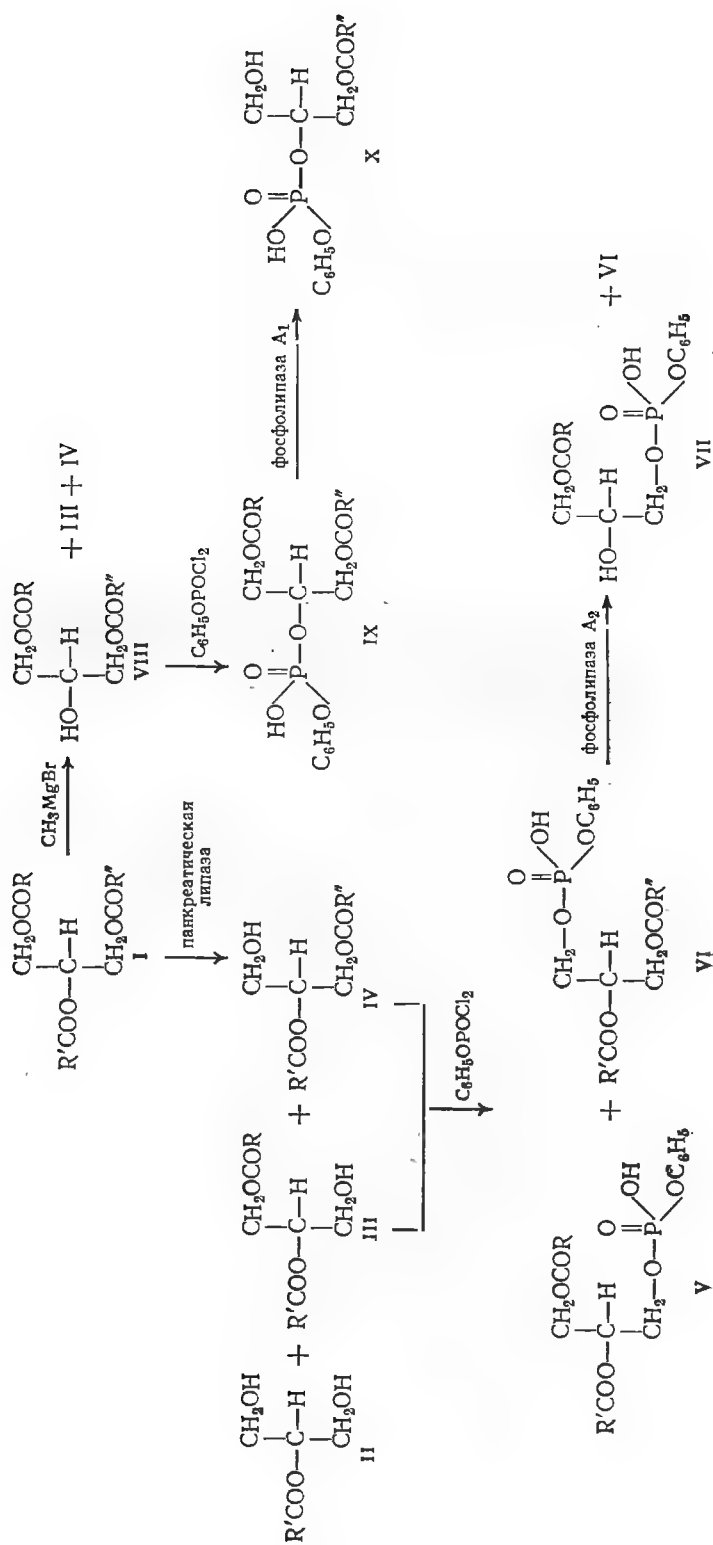
Действием перхлорной кислоты 2-моноглицериды можно перевести в 1-моноглицериды и далее провести их полный гидролиз до глицерина.

Панкреатическая липаза не проявляет специфичности и стереоспецифичности в отношении жирных кислот, а также не обнаруживает различия между положениями 1 и 3 в молекулах триглицеридов, что затрудняет их полный стереоспецифический анализ.

Известные в настоящее время методы стереоспецифического анализа триглицеридов (см. схему на стр. 229) включают следующие этапы: 1) частичный химический или ферментативный гидролиз триглицеридов до диглицеридов, 2) превращение диглицеридов в фосфатидовые кислоты или их производные, 3) анализ полученных фосфолипидов с помощью стереоспецифических фосфолипаз.

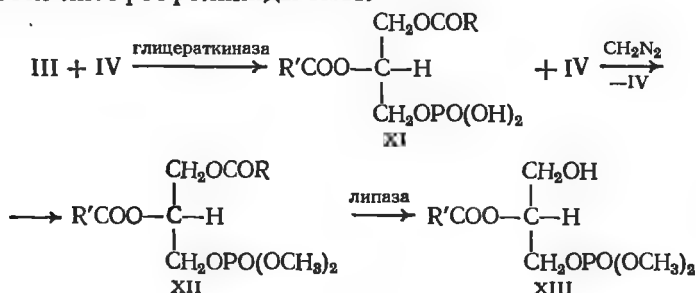
При гидролизе триглицеридов I панкреатической липазой образуется смесь 2-моноацил-(II), 1,2-(III) и 2,3-диацил-*sn*-глицеринов (IV). Моноглицерид II отделяют, а диглицериды III и IV фосфорилируют фенилди-хлорфосфатом, получая соответствующие фениловые эфиры фосфатидовых кислот (V и VI). Разделение последних основано на гидролизе фосфолипазой A₂, которая специфична для производных 1,2-диацил-*sn*-глицерина и расщепляет лишь соединение V с образованием лизофосфолипида VII. Соединения VI и VII разделяют с помощью хроматографии и в соединении VII определяют жирную кислоту в положении 1 стандартным методом.

При действии на триглицериды I CH₃MgBr образуются в основном 1,3-диглицериды VIII с примесью изомерных 1,2- и 2,3-диацил-*sn*-глицеринов III и IV, которые могут быть отделены с помощью тонкослойной хроматографии. Фосфорилирование 1,3-диглицеридов VIII приводит к соединению IX, при гидролизе которого фосфолипазой A₁, отщепляющей остатки жирных кислот в положении 1, образуется 2-фосфо-3-ацил-



sn-глицерин (лизосоединение) X, в котором далее кислота в положении 3 определяется обычными методами.

Кроме того, для разделения 1,2- и 2,3-диацил-*sn*-глицеринов III и IV используют селективное фосфорилирование 1,2-изомера с помощью глицераткиназы *E. Coli* (2.7.1.31) в фосфатидовые кислоты XI, которые затем переводят в диметилловые эфиры XII. Далее отделяют соединение IV, а соединение XII обрабатывают панкреатической липазой. При этом отщепляются жирные кислоты при C₁ (их подвергают анализу) и образуются лизофосфолипиды XIII:



При действии на диглицерид IV панкреатической липазы отщепляются жирные кислоты при C₃.

Исследования, выполненные с синтетическими триглицеридами известной структуры, показали, что точность стереоспецифического анализа составляет 1,5—2%.

С помощью ферментативных методов исследована глицеридная структура многих растительных масел, животных жиров и установлены определенные закономерности в распределении жирнокислотных остатков в молекулах глицеридов.

В растительных маслах насыщенные жирные кислоты этерифицируют предпочтительно первичные гидроксильные группы молекулы глицерина; это подтверждено экспериментальными данными для таллового и подсолнечного масел, масла бобов какао и других. В большинстве животных жиров насыщенные кислоты присутствуют в положении 2 молекулы глицерина.

Пространственная структура глицеридов

Рентгеноструктурными и вискозиметрическими исследованиями установлено, что кислотные остатки в молекуле триглицерида представляют собой тетраэдрические зигзагообразные цепи, расположенные в параллельных плоскостях и ориентированные параллельно друг другу [52]. В зависимости от пространственного расположения жирнокислотных остатков в кристаллах триглицеридов для них предложены конфигурации вилки, кресла и стержня (рис. 23). По данным рентгеноструктурного анализа, по-видимому, наиболее экономична (с наименьшей потенциальной энергией) упаковка молекул в форме стержня. Однако в высоковязких расплавах глицеридов возможно изгибание и перепутывание кислотных цепей, а с понижением температуры — образование сложных клубков молекул, которые распадаются лишь при повышении температуры до определенной точки.

Подобно другим соединениям с длинными углеводородными цепями, глицериды высших жирных кислот могут существовать в виде не-

скольких кристаллических модификаций, т. е. полиморфных форм. Различают два вида полиморфизма: энантиотропный (обратимый) и монотропный, исключающий возможность обратимого перехода одной кристаллической формы в другую. Глицериды высших жирных кислот являются классическим примером монотропного полиморфизма.

Термический, рентгеноструктурный, спектральный и другие методы анализа указывают на преимущественное существование для триглицеридов трех полиморфных форм (α , β , β'). Однако не исключается возможность наличия для некоторых соединений четырех (α , β , β' , β'') и даже пяти модификаций (α , β , β' , β'' , γ) [53].

Полиморфизм в основном объясняют тем, что кислотные зигзагообразные цепи, расположенные параллельно, могут характеризоваться различным углом наклона длинной оси молекулы к оси кристаллической

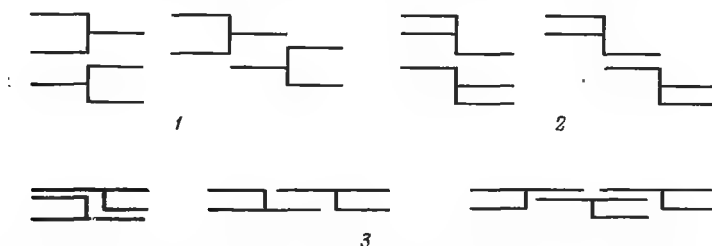


Рис. 23. Возможные конфигурации молекул в кристаллах триглицеридов:
1 — вилки; 2 — кресла; 3 — стержня.

ячейки. В лабильных полиморфных формах (γ , α , β' , β'') углеводородные цепи расположены вертикально, т. е. перпендикулярно к основанию кристаллической ячейки (угол наклона 90°), а в стабильных (β) — наклонно к поверхности кристаллов. Перечисленные модификации образуют термический ряд кристаллов, в которых степень стабильности форм возрастает с увеличением температур плавления. Необратимый переход нестабильных форм в стабильную β -форму совершается по правилу Оствальда, т. е. γ -форма переходит в α -форму, а последняя — в более высокоплавкие β' - и β -модификации. У некоторых глицеридов β -форма отсутствует и наиболее стабильной является β' -форма.

γ -Форма представляет собой наиболее легкоплавкую нестабильную полиморфную форму глицеридов, получаемую быстрым охлаждением расплавов в отсутствие зародышей α -, β' - и β -форм. Вблизи своей температуры плавления γ -модификация переходит в течение нескольких секунд в α -форму, при 0°C это превращение осуществляется за несколько минут. Полагают, что γ -форма обладает свойствами органических стекол (прозрачность, анизотропия в проходящем поляризованном свете и другие), характеризуется наибольшим удельным объемом, т. е. наименьшей плотностью, и наиболее высокой диэлектрической проницаемостью по сравнению с другими полиморфными формами. α -Форма более устойчива, чем γ -форма, превращение ее в β' -модификацию осуществляется в течение нескольких часов, в условиях низких температур стабильность ее увеличивается. Скорость перехода $\beta' \rightarrow \beta$ измеряется несколькими неделями.

Полиморфизм наблюдается также у моно- и диглицеридов. Для 1,2- и 1,3-диглицеридов на основании экспериментальных данных пред-

ложены две кристаллические модификации (α и β'), а для некоторых соединений обнаружены β' - и β -формы. 1-Моноглицериды характеризуются наличием трех кристаллических форм (α , β' , β), а у 2-моноглицеридов полиморфизм, как правило, не проявляется.

Полиморфные формы триглицеридов можно классифицировать на три кристаллографических типа соответственно упаковке их углеводородных цепей или микросимметрии кристаллической ячейки: гексагональная, орторомбическая, триклиническая. На основании данных ИК-спектроскопии и ядерного магнитного резонанса установлено наличие гексагональной микросимметрии у α -формы триглицеридов, орторомбической у β' -формы и триклинической — у β -модификации.

Для исследования полиморфизма глицеридов применяют совокупность различных физико-химических методов исследования. Изучение микроструктуры полиморфных фаз осуществляют с помощью микроскопа в проходящем поляризованном свете. Кинетику процесса полиморфных превращений фаз исследуют посредством микрокино съемки, которая позволяет фиксировать медленно и быстро протекающие процессы [52]. Метод дифференциального термического анализа широко используется для исследования плавления и полиморфных переходов индивидуальных триглицеридов и их смесей (растительные масла, животные жиры и др.). Он основан на непрерывной регистрации выделения тепла при затвердевании или его поглощения при плавлении по кривым разности температур между окружающей средой и пробой триглицерида при его охлаждении или нагревании соответственно. Дифференциальный термический анализ находит применение в жировой промышленности для контроля качества сырья и готовой продукции.

Фазовые изменения, например плавление или превращение в другие полиморфные формы, связаны с определенными тепловыми эффектами и изменениями удельных объемов. Каждой полиморфной форме соответствуют определенные теплоты плавления и коэффициенты расширения. Фазовые изменения фиксируются калориметрическими и дилатометрическими методами. Исследуемый образец помещают в калориметр при температуре на 10°C ниже температуры плавления самой низкоплавкой формы и нагревают со скоростью $1,1^\circ\text{C}/\text{мин}$ до конца плавления. Полученные кривые нагревания и охлаждения информируют о взаимопревращениях полиморфных форм. Дилатометрические измерения позволяют определить соотношения твердой и жидкой фазы в жирах.

Для изучения полиморфных форм используют ИК-спектроскопию. Основные различия между спектрами полиморфных форм, снятых в кристаллических пленках, наблюдаются в области $720\text{--}1250\text{ см}^{-1}$. Как правило, наличие двух полос в области 720 см^{-1} (727 и 719 см^{-1}) характеризует орторомбическую упаковку цепей, присущую β' -форме. В случае α - и β -модификаций в этой области проявляется одиночная полоса, соответствующая гексагональной и триклинической упаковкам.

ИК-Спектроскопия не дает четкого различия между гексагональной и триклинической микросимметрией ячейки; в этом случае используют спектры протонного магнитного резонанса, с помощью которых α -форма легко отличима от β - и β' -модификаций.

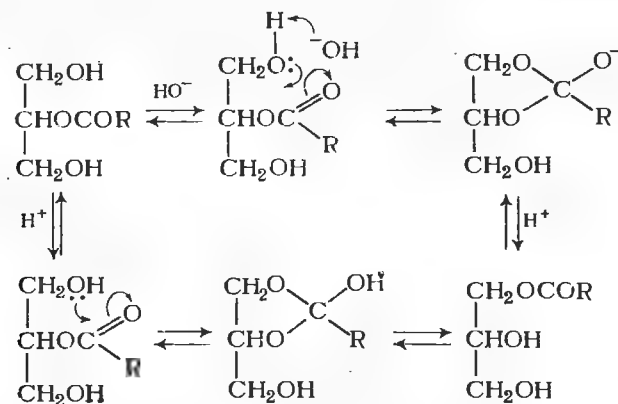
Для изучения полиморфизма глицеридов используют также метод дифракции рентгеновских лучей, который дает существенную информацию об угле наклона углеводородных цепей к поверхности кристаллической ячейки.

Ацильная миграция. Одной из важнейших проблем химии липидов, с которой необходимо считаться при синтезе и выделении различных классов липидов, в первую очередь моно-, ди- и триглицеридов, является ацильная миграция, которая происходит под действием различных катализаторов, при нагревании [54, 55] или при хроматографии на ряде адсорбентов [56].

Основным типом ацильной миграции в ряду глицеридов является изомеризация 2-моноголицеридов или 2,3-диглицеридов в соответствующие 1- и 1,3-изомеры в условиях основного или кислотного катализа.

Принято считать, что основной движущей силой ацильной миграции является пространственный эффект, выражающийся в тенденции превратить разветвленную и менее термодинамически стабильную форму 2-моноглицерида или 2,3-диглицерида в линейную и термодинамически более стабильную форму 1-моно- и 1,3-диглицеридов [57].

До настоящего времени не выработано единой точки зрения на механизм изомеризации глицеридов [57, 58]. Фишер и ряд других авторов выдвинули классическую концепцию, согласно которой ацильная миграция проходит через стадию образования промежуточного циклического пятичленного ортоэфира:



Равновесие изомеризации сдвинуто в сторону термодинамически более стабильных 1-моно- и 1,3-диглицеридов.

В случае моноглицеридов соотношение 2- и 1-изомеров при равновесии составляет приблизительно 1:9, в то время как в случае диглицеридов отношение 2,3- и 1,3-изомеров приблизительно равно 1:1,5 [55]. Это различие может быть объяснено гидрофобным взаимодействием между углеводородными цепями в 2,3-диглицеридах, вследствие чего их изомеризация в линейные 1,3-изомеры затруднена по сравнению с 2-моноглицеридами [57]. В случае глицеридов с разветвленными или ненасыщенными жирнокислотными остатками равновесие изомеризации достигается быстрее.

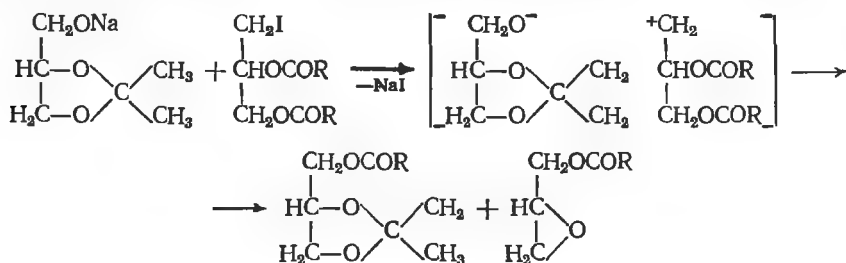
Исходя из предложенного механизма ацильной миграции и экспериментально установленного факта, что первая стадия — образование промежуточного ортоэфира является стадией, контролирующей скорость реакции, легко объяснить влияние структуры жирноокислотных цепей на скорость ацильной миграции. Известно, что уменьшение дли-

ны цепи жирнокислотных остатков в молекуле моно- и диглицеридов вызывает увеличение скорости миграции. Этот факт с позиций предложенного механизма может быть объяснен тем, что в случае длинных углеводородных цепей жирнокислотных остатков затруднено образование промежуточного ортоэфира из-за большей деформации цикла. Вследствие этого первая стадия требует большей энергии активации, результатом чего является замедление общей реакции.

Введение в ацильные остатки различных заместителей замедляет изомеризацию, так как пространственное взаимодействие между заместителями препятствует образованию промежуточного ортоэфира и тем сильнее, чем ближе находятся они к сложноэфирной группе. При этом, безусловно, имеет значение не только размер вводимого заместителя, но и вызываемые им электронные эффекты. Так, увеличение электронной плотности на карбонильном углероде сложноэфирного остатка уменьшает скорость изомеризации.

В противоположность классической концепции о механизме ацильной миграции как о внутримолекулярной перегруппировке через стадию промежуточного ортоэфира, высказано предположение, что ацильная миграция в полиолах может рассматриваться как межмолекулярный процесс, включающий образование ионной пары и ацильный обмен между двумя радикалами, образующими эту ионную пару [58]. Считают, что образование ионных пар может происходить при нагревании глицеридов в безводных условиях или при действии кислот или щелочей.

Подобные ионные пары были специально получены с целью проверки предложенного механизма. В частности, при взаимодействии натриевой соли 2,3-изопропилиденглицерина с 2,3-дистеароил-1-иод-1-дезоксиглицерином наблюдалось образование ионной пары. Далее происходила межмолекулярная перегруппировка ацильных групп с образованием 1-стеароил-2,3-изопропилиденглицерина и 1-стеароил-2,3-эпоксиглицерина:



Показано, что если ацильные группы входят в состав только одного из ионов этой ионной пары, они подвергаются миграции как по внутримолекулярному, так и по межмолекулярному механизмам. Однако, если ацильные группы входят в состав обоих ионов, они подвергаются межмолекулярному обмену. Подтверждением межмолекулярного механизма миграции считают факт образования бис(глицериловых) эфиров как компонентов равновесной смеси, полученной при изомеризации 2-моностеарата хлористым водородом в безводном эфире.

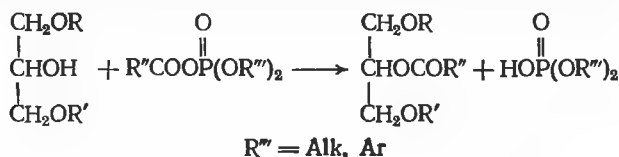
Способы ацилирования. Для введения ацильных остатков в молекулу глицерина и его производных применяют следующие ацилирующие агенты: высшие жирные кислоты, галогенангидриды и ангидриды выс-

ших жирных кислот, ацилфосфаты, соли и эфиры высших жирных кислот.

Наиболее широкое распространение получил способ ацилирования с помощью доступных галогенангидридов высших жирных кислот, получаемых при обработке кислот хлористым тиоилом, оксалилхлоридом или треххлористым фосфором. Этерификация проводится в среде хлороформа, четыреххлористого углерода, диметилформамида и в присутствии органических оснований (пиридин, хинолин, триэтиламин и др.) [56].

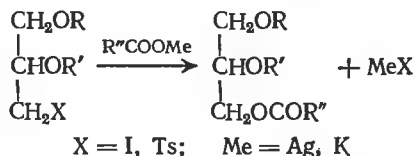
В некоторых случаях ацилирование осуществляется при действии ангидридов высших жирных кислот, для получения которых предложен эффективный метод, основанный на обработке кислот дициклотексилкарбодиимидом [59]. Ацилирование ангидридами высших жирных кислот проводят в присутствии кислотных или основных катализаторов (перхлорная кислота, тетраэтиламмониевые и калиевые соли высших жирных кислот). При использовании кислотных катализаторов следует считаться с возможностью ацильной миграции, хотя, как правило, скорость ацилирования превышает скорость изомеризации.

Ацилирование ацилфосфатами, смешанными ангидридами карбоновых и замещенных фосфорных кислот, проводится в мягких условиях в течение короткого периода времени в присутствии перхлорной кислоты; при этом образуются достаточно чистые продукты [60]:



Однако метод не нашел широкого использования, что, по-видимому, обусловлено определенными трудностями синтеза самих ацилфосфатов и их высокой лабильностью.

Для этерификации производных глицерина применяют также реакцию иодгидринов замещенного глицерина [61] или его сульфозэфиров [62] с серебряными или калиевыми солями высших жирных кислот в среде апротонных биполярных растворителей (диметилформамид, диметилсульфоксид):

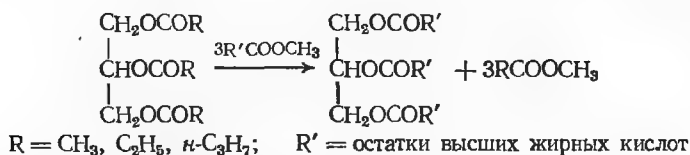


Реакция оптически активных 2-*n*-толуолсульфонатов замещенного глицерина с калиевыми солями высших жирных кислот является удобным методом обращения конфигурации с одновременным введением жирнокислотного остатка [63]:

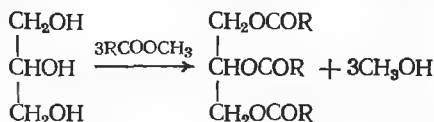


Для получения глицеридов с остатками высших жирных кислот используют катализируемую основаниями переэтерификацию глицеридов

низших кислот метиловыми или этиловыми эфирами высших жирных кислот:



Разновидностью реакции переэтерификации является глицеролиз, осуществляемый взаимодействием глицерина с эфирами высших жирных кислот:



Этерификация глицерина и его производных высшими жирными кислотами проводится путем длительного нагревания компонентов в присутствии кислотного катализатора с азеотропной отгонкой воды. Этот способ не нашел широкого применения.

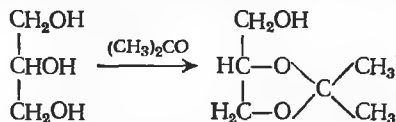
Защита функциональных групп. Основная проблема синтеза сложных эфиров глицерина различной структуры (моно-, ди- и триглицериды) связана с избирательным введением ацильных групп в молекулу спирта. Это создает необходимость защиты гидроксильных групп глицерина.

Введение и снятие защитных групп должно проводиться в условиях, исключающих разрыв сложноэфирных связей и ацильную миграцию; в случае оптически активных производных глицерина следует считаться с возможностью рацемизации.

При получении ненасыщенных глицеридов возникают дополнительные ограничения, обусловленные необходимостью сохранения структуры и конфигурации двойных связей в ацильных остатках при удалении защитных групп.

Ацетальные и кетальные защиты. Широкое распространение в химии липидов для защиты гидроксильных групп глицерина получили ацетальные и кетальные группировки, устойчивые в щелочной среде и сравнительно неустойчивые к действию кислот.

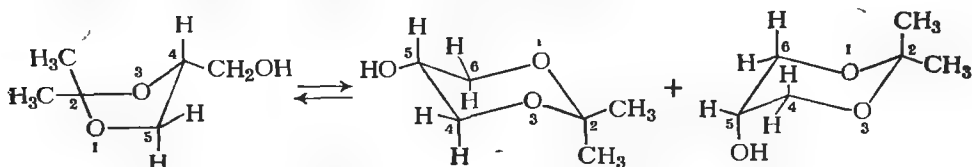
Для защиты диольной системы широко применяют изопропилиденовую группировку:



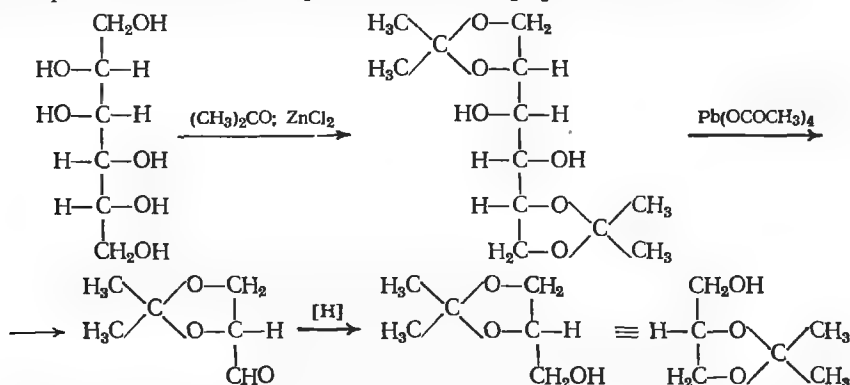
Введение ее в молекулу глицерина и его производных осуществляется при взаимодействии с ацетоном в присутствии кислотных катализаторов (органические и неорганические кислоты, ионообменные смолы в H^+ -форме и т. д.) и различных дегидратирующих агентов (Na_2SO_4 , ZnCl_2 и др.) [64, с. 222].

Изопропилиденглицерин существует почти исключительно в 1,2(или 2,3)-форме, однако показана возможность присутствия 1,3-изомера (~5%). Изомеризация пятичленного кольца 1,2-изопропилиденглицерина в два возможных шестичленных кольца 1,3-изопропилиденглицерина энергетически невыгодна вследствие сильного стерического взаимо-

действия в шестичленных кольцах между аксиальной CH_3 -группой в положении 2 и аксиальными атомами водорода в положениях 4 и 6:



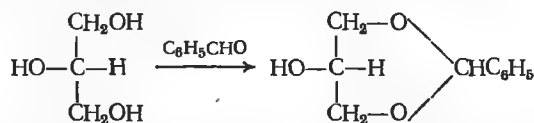
1,2-Изопропилиден-*sn*-глицерин является исходным оптически активным веществом в синтезе глицеросодержащих липидов всех классов, в том числе глицеридов. Получение его проводят на основе доступного *D*-маннита [65]:



Применение в качестве катализатора и дегидратирующего агента хлорида цинка позволяет направить процесс в сторону преимущественного образования 1,2:5,6-ди-*O*-изопропилиденового производного, которое далее подвергалось окислительному расщеплению тетраацетатом свинца в 1,2-изопропилиден-*sn*-глицериновый альдегид. Последний восстанавливался в присутствии скелетного никелевого катализатора или с помощью литийалюминийгидрида в соответствующий спирт.

Снятие изопропиленовой группировки проводится при действии разбавленных водных или спиртовых растворов органических и минеральных кислот, с помощью ионообменных смол (в H^+ -форме) и т. д. В последнее время для снятия изопропиленовой группировки в условиях, исключающих ацильную миграцию, используют гидролиз борной кислотой в 2-метоксиэтаноле или триалкилборатах с последующим разложением эфира ортоборной кислоты водой [66].

Бензилиденевая группировка в синтетической химии глицеридов используется преимущественно при получении 2-моноглицеридов. В отличие от ацетона бензальдегид реагирует с глицерином с образованием шестичленного диоксанового цикла:

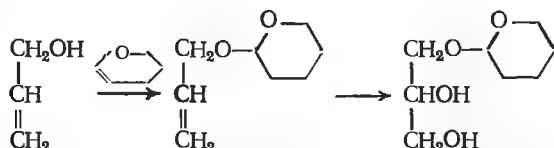


Конденсацию бензальдегида с глицерином проводят в присутствии различных кислотных агентов (хлористый цинк, газообразный хлористый водород и т. д.).

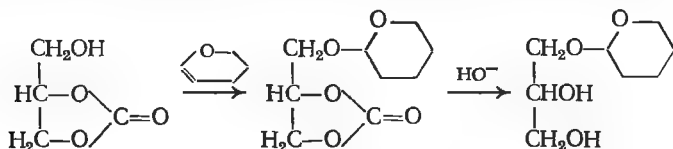
Снятие бензилиденевой группировки осуществляют кислотным гидролизом, действием борной кислоты в триметил- или триэтилборатах, а также каталитическим гидрированием в присутствии платинового или

палладиевого катализаторов. Удаление бензилиденовой защиты в условиях кислотного гидролиза сопровождается ацильной миграцией; при использовании борной кислоты миграция не происходит вследствие образования эфиров ортоборной кислоты.

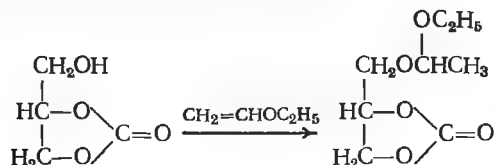
Для защиты одной из гидроксильных групп молекулы глицерина используют смешанные ацетали, из которых наиболее употребительны тетрагидропираниловые эфиры, полученные при взаимодействии спиртовой компоненты с дигидропираном в присутствии кислотных катализаторов [64]. Рацемический тетрагидропираниловый эфир глицерина можно получить на основе аллилового спирта с последующим гидроксिलированием [67]:



Введение тетрагидропиранильной группы в молекулу глицерина осуществляется при наличии щелочнолабильной группировки, например циклокарбонатной, блокирующей диольную систему [68]:



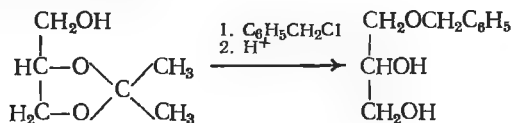
Аналогично осуществляется введение этоксиэтильной защитной группировки действием этилвинилового эфира:

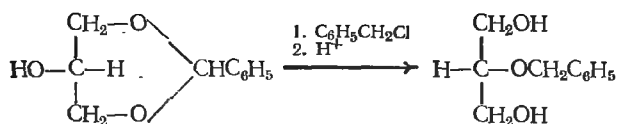


При удалении смешанных ацетальных защит в условиях мягкого кислотного гидролиза не происходит существенной ацильной миграции (2—3%), а при использовании борной кислоты ее практически не наблюдается [68].

Защиты с простой эфирной связью. В химии глицеридов для защиты гидроксильных групп широко используют бензиловые и трифенилметилловые (трителивые) эфиры, которые устойчивы к действию щелочных агентов и многих окислителей, но легко расщепляются сильными кислотами и восстановителями.

Для получения изомерных 1- или 2-бензиловых эфиров глицерина обычно используют 1,2-изопропилиденглицерин [56] или 1,3-бензилиденглицерин [69] с последующим удалением этих защитных групп мягким кислотным гидролизом:

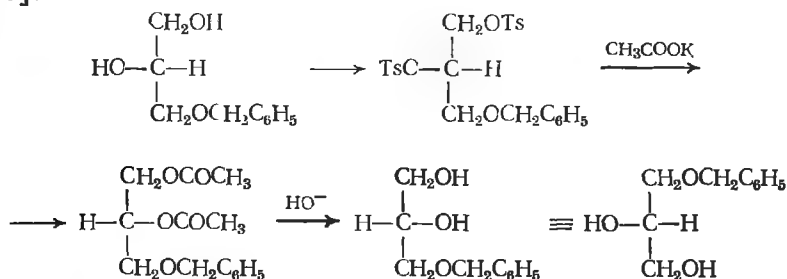




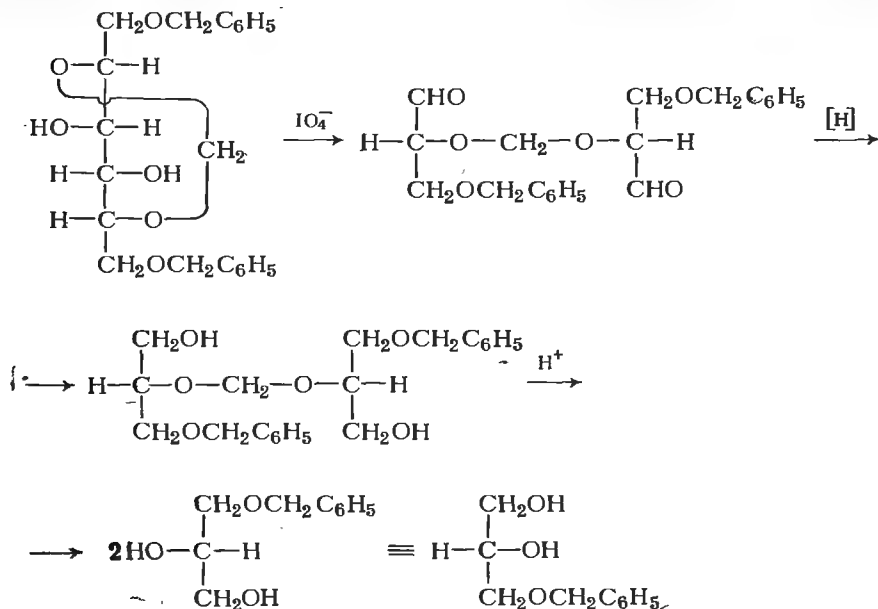
Введение бензильных групп осуществляется действием хлористого бензила в присутствии щелочей или бромистого бензила в присутствии окиси серебра. Скорости бензилирования первичной и вторичной гидроксильных групп в молекуле глицерина примерно одинаковы. Бензильные группы удаляют каталитическим гидрированием в присутствии палладиевого катализатора или действием металлического натрия в спирте.

В синтезе оптически деятельных глицеридов и других нейтральных липидов используют 1-О- и 3-О-бензил-*sn*-глицерины.

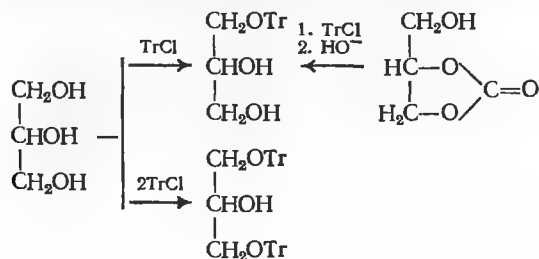
Получение 3-О-бензил-*sn*-глицерина осуществляют на основе доступного 1,2-изопропилиден-*sn*-глицерина [70]. Для синтеза 1-О-бензил-*sn*-глицерина проводят вальденовское обращение 3-О-бензил-*sn*-глицерина с использованием классического метода обращения конфигурации спиртов [71]:



В методе, предложенном Р. Гиггом [72], получение 1-О-бензил-*sn*-глицерина проводят на основе 1,6-дibenзил-2,5-метилен-*D*-маннита:

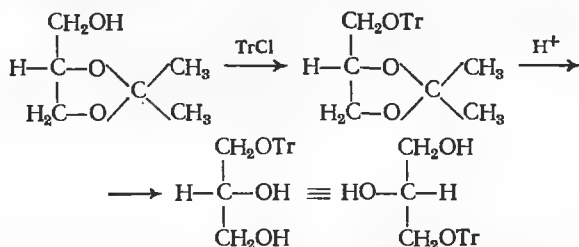


Для специфической защиты первичной гидроксильной группы в молекуле глицерина и его производных используют тритиловые эфиры, получаемые действием трифенилхлорметана в пиридине:

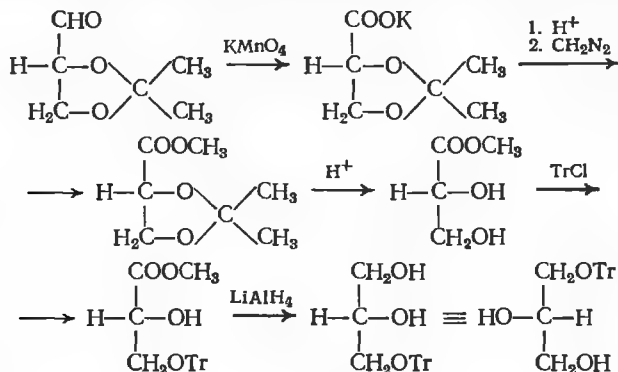


Для получения энантиомерных 1-О- и 3-О-тритиловых эфиров *sn*-глицерина предложены различные методы [73].

Для синтеза 3-О-тритил-*sn*-глицерина проводят тритилирование 1,2-изопропилиден-*sn*-глицерина и затем снимают изопропилиденовую защиту, используя несколько бо́льшую ее лабильность к действию кислотных агентов (например, к трихлоруксусной кислоте) по сравнению с тритильной группировкой:

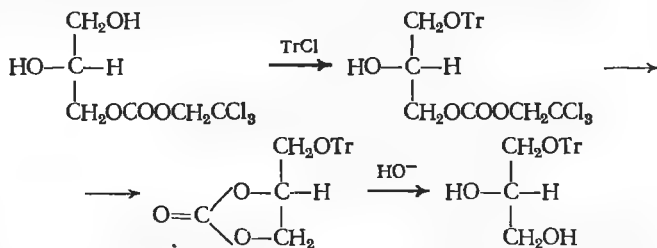


Получение 1-О-тритил-*sn*-глицерина осуществляют с помощью многостадийного процесса: окисление 1,2-изопропилиден-*sn*-глицеринового альдегида в 1,2-изопропилиден-*sn*-глицериновую кислоту, превращение кислоты в метиловый эфир, снятие изопропилиденовой защиты, тритилирование метилового эфира 3-*sn*-глицериновой кислоты и восстановление полученного тритильного производного литийалюминийгидридом:

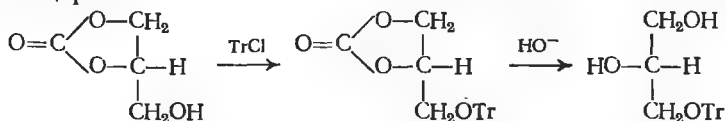


Значительно удобнее методы получения 1-О- и 3-О-тритил-*sn*-глицеринов с использованием смешанных и циклических карбонатов [74]. Так, 1-О-тритил-*sn*-глицерин можно получить тритилированием 3-β,β,β-

трихлорэтилкарбоната *sn*-глицерина, циклизацией полученного при этом соединения и последующим снятием циклической карбонатной группы:



3-О-Тритил-*sn*-глицерин получают также, исходя из 1,2-циклокарбоната *sn*-глицерина:



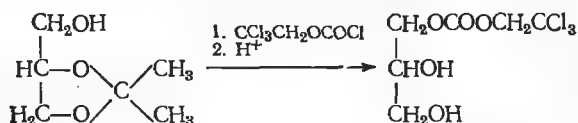
Снятие тритильной группы в глицеридах можно проводить кислотным гидролизом, однако при этом наблюдается ацильная миграция и образуется равновесная смесь изомеров. При синтезе насыщенных глицеридов детритилирование удобнее проводить каталитическим гидрированием в присутствии платинового или палладиевого катализаторов. Предложен метод детритилирования при хроматографии на кремневой кислоте или силикагеле, однако он не имеет препаративного значения в связи со специфическими требованиями, предъявляемыми к адсорбенту, трудностью отделения от образующегося трифенилкарбинола и наблюдаемой частичной изомеризацией глицеридов. Детритилирование с помощью борной кислоты сопровождается меньшей ацильной миграцией, чем в случае применения других методов [74].

Ациклические и циклические карбонаты. Ациклические карбонаты используют в синтезе глицеридов для защиты одной из гидроксильных групп молекулы глицерина, а циклические карбонаты позволяют обеспечить защиту диольной системы.

Ациклические и циклические карбонаты устойчивы в кислой среде, в условиях ацилирования, окисления и по отношению к ряду реагентов (хлористый тионил, бромистый водород в смеси уксусной кислоты и уксусного ангидрида и т. д.). Эти свойства позволяют использовать карбонатную защиту в сочетании с ацетальными группировками в синтезе глицеридов.

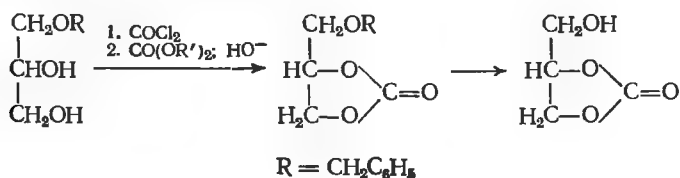
Из ациклических карбонатов в синтезе глицеридов впервые была использована карбобензоксильная группировка, вводимая при действии карбобензоксихлорида в среде пиридина. Эта группировка отщепляется при гидрогенолизе в присутствии палладиевого катализатора. Широкого применения для защиты спиртового гидроксила в химии глицеридов карбобензоксильная группа не нашла.

Значительно более перспективной является карботрихлорэтоксигруппа, вводимая действием трихлорэтилхлоругольного эфира в среде пиридина:

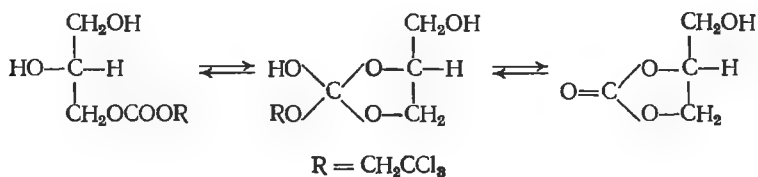


Несомненным достоинством данной группировки является возможность снятия ее при действии цинка в уксусной кислоте или метаноле в условиях, не сопровождающихся ацильной миграцией, что позволяет использовать ее в синтезе ненасыщенных глицеридов.

Циклические карбонаты, нашедшие первоначально свое применение в химии углеводов, в настоящее время с успехом используются в химии липидов при получении различных представителей нейтральных липидов. Для получения циклических карбонатов монозамещенного глицерина разработано несколько методов: взаимодействие монозамещенного глицерина с фосгеном в пиридине при 0°C [68], а также реакция перэтерификации с полными эфирами угольной кислоты в присутствии щелочных катализаторов с одновременным удалением из сферы реакции образующегося спирта [75]:

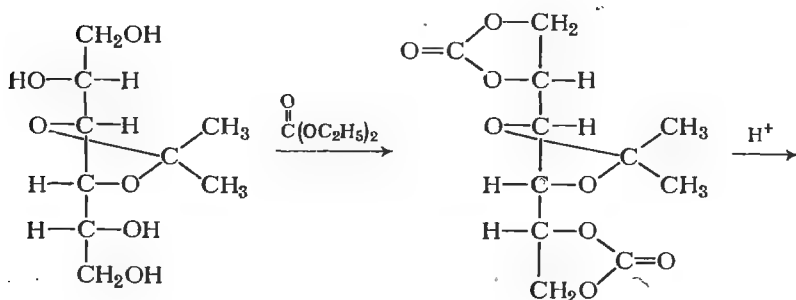


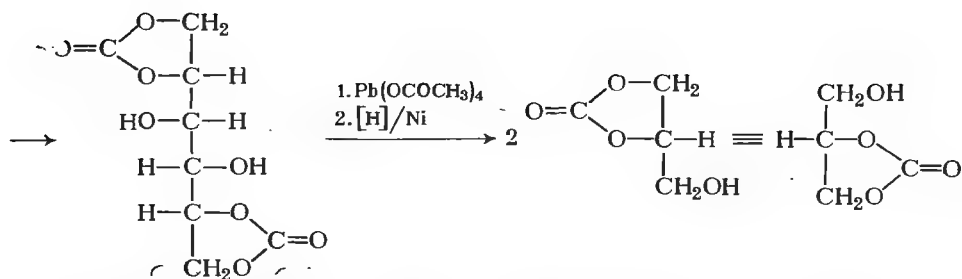
Удобным является вариант, основанный на циклизации смешанных карбонатов, в частности, β,β,β -трихлорэтилкарбоната глицерина, при нагревании с пиридином [74]:



Энантиомерные 1,2- и 2,3-циклокарбонаты *sn*-глицерина синтезируют соответственно из 3-О- и 1-О-бензил-*sn*-глицеринов [76] указанными выше способами.

1,2-Циклокарбонат *sn*-глицерина можно также получать, исходя из 3,4-изопропилиден-*D*-маннита без применения защитной бензильной группы [77]:





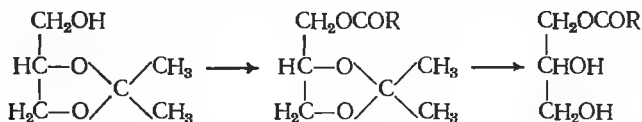
1,2-Циклокарбонат *sn*-глицерина использован для получения 3-О-тетрагидропиранил-*sn*-глицерина, применяемого в синтезе глицеридов [68], а 2,3-циклокарбонат — в синтезе нейтральных плазмалогенов [78].

В зависимости от конкретной задачи в синтезе глицеридов могут быть использованы различные сочетания и последовательность введения указанных защитных групп. Необходимы дальнейшие поиски в этом направлении.

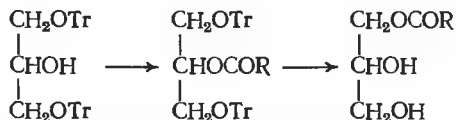
Синтез моноглицеридов

1-Моноглицериды. Синтез 1-моноглицеридов может быть осуществлен по двум направлениям: 1) синтезы с использованием защитных групп, 2) синтезы без применения защит, основанные на различной реакционной способности первичных и вторичных групп молекулы глицерина.

Классическим синтезом 1-моноглицеридов является метод Фишера, основанный на ацилировании 2,3-изопропилиденглицерина и последующем снятии защитной группировки в условиях, исключающих ацильную миграцию:



Моноглицериды могут быть получены также введением ацильных групп в молекулу 1,3-дитритилглицерина с последующей миграцией ацильного остатка в положение 1 в условиях детритилирования при действии кислот:

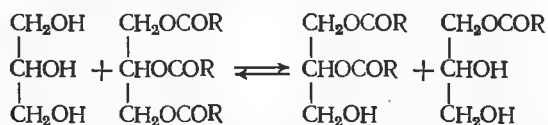


Однако при этом возможна примесь 2-изомера, вследствие существования равновесия между 1- и 2-формами. Метод не получил широкого применения.

Синтез 1-моноглицеридов без применения защит осуществляется либо этерификацией глицерина, либо глицеролизом триглицеридов. Установлено, что относительная скорость этерификации первичной и вторичной гидроксильных групп в молекуле глицерина неодинакова. Однако при этом, как правило, образуется смесь моно-, ди- и триглицеридов. Для преимущественного образования 1-моноглицеридов ацилирование проводят в присутствии большого избытка глицерина или при добавле-

нии различных комплексообразующих агентов (тиоцианат калия, триэтилфосфат, уретаны и т. д.).

Глицеролиз, разновидность реакции перэтерификации, имеет промышленное применение для получения моноглицеридов жирных кислот, используемых в качестве эмульгаторов при производстве маргарина. Глицеролиз проводят в присутствии щелочных катализаторов или азотистых оснований:



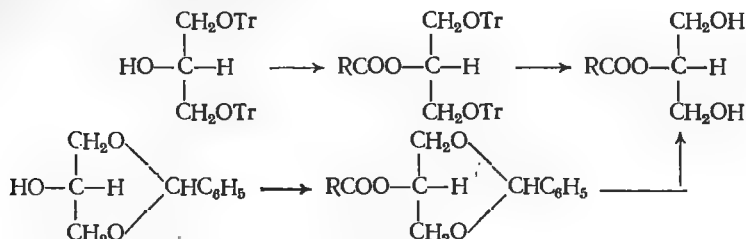
Ненасыщенные жирные кислоты, входящие в состав глицеридов, по уменьшению их реакционной способности при глицеролизе можно расположить в следующий ряд

Линоленовая > Линолевая > Олеиновая > Элеостеариновая > Эруковая

т. е. более ненасыщенные кислоты легче поддаются алкоголизу.

Наиболее удобным препаративным методом синтеза насыщенных и ненасыщенных 1-моноглицеридов до настоящего времени остается классический изопропилиденовый способ.

2-Моноглицериды. 2-Моноглицериды получают ацилированием 1,3-дитритилглицерина или 1,3-бензилиденглицерина с последующим удалением защитных групп:

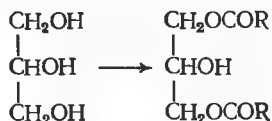


В зависимости от условий снятия защитных групп можно получить насыщенные или ненасыщенные 2-моноглицериды.

Синтез диглицеридов

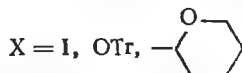
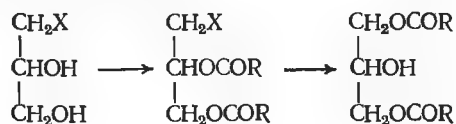
1,3-Диглицериды. Для синтеза симметричных 1,3-диглицеридов разработаны различные методы.

Однокислотные 1,3-диглицериды получают непосредственным ацилированием глицерина хлорангидридами высших жирных кислот в среде диметилформаида и в присутствии органических оснований:



Однако процесс протекает неоднозначно и возможно образование примесей моно-, 1,2-ди- и триглицеридов.

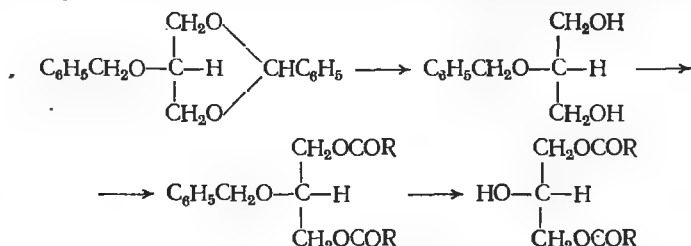
Вторая группа методов основана на ацилировании монозамещенного глицерина и последующей изомеризации образующихся 1,2-диглицеридов в условиях удаления защит:



При $\text{X}=\text{I}$ ацильная миграция происходит на стадии замены иода на гидроксил, осуществляемой кипячением с водноспиртовым раствором нитрата серебра. В случае применения тритильной и тетрагидропиранильной защит, удаляемых при действии кислот, возможно получение ненасыщенных соединений.

Основным недостатком методов, включающих ацильную миграцию, является образование 1,2-изомера в количестве 15—20%. Однако в связи с разработкой методов разделения 1,2- и 1,3-диглицеридов при хроматографии на кремневой кислоте или силикагеле, импрегнированных борной кислотой, эти методы могут найти применение.

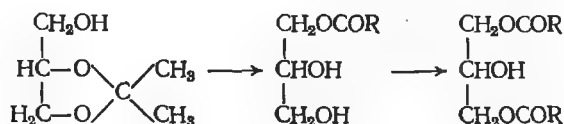
Синтез 1,3-диглицеридов введением жирнокислотных остатков в молекулу 2-бензилглицерина с последующим удалением защиты каталитическим гидрированием ограничен областью синтеза насыщенных соединений [79]:



Для получения этим методом ненасыщенных 1,3-диглицеридов двойные связи кислотных остатков можно защитить присоединением брома с последующим дебромированием после удаления бензильной защиты. Однако следует учитывать, что дебромирование с помощью цинка сопровождается частичной *цис*→*транс*-изомеризацией двойных связей (образуется ~5% *транс*-изомера).

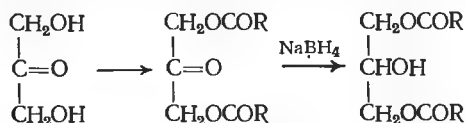
При использовании ступенчатого ацилирования возможно получение смешанных 1,3-диглицеридов.

Широкое распространение для синтеза различных 1,3-диглицеридов (насыщенных и ненасыщенных, «одно- и разнокислотных») получил метод направленного ацилирования первичной ОН-группы 1-моноглицеридов эквивалентными количествами хлорангидридов высших жирных кислот [80]:



Незначительные примеси моно- и триглицеридов легко удаляются при хроматографии.

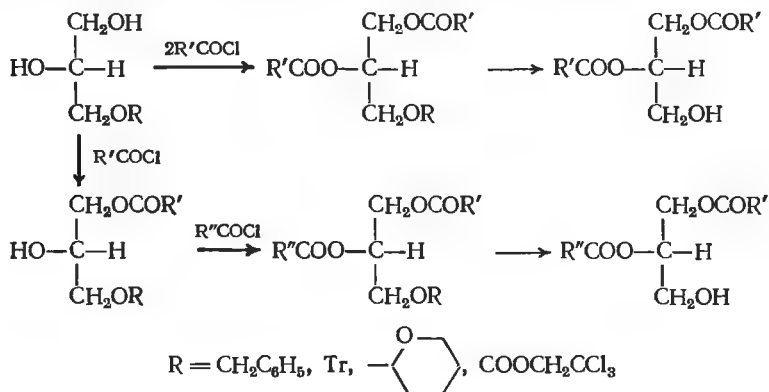
Удобным исходным сырьем в синтезе 1,3-диглицеридов является диоксиацетон [81]. Он легко ацилируется хлорангидридами кислот в присутствии органических оснований, а затем карбонильная группа восстанавливается NaBH_4 в тетрагидрофуране при 5°C :



При этом не наблюдается образования ощутимых количеств 1,2-диглицерида. Метод пригоден для получения ненасыщенных 1,3-диглицеридов.

Несимметричные диглицериды. Особый интерес, проявляемый к получению данной группы глицеридов, обусловлен тем, что они являются ключевыми соединениями в синтезе биологически важных фосфолипидов.

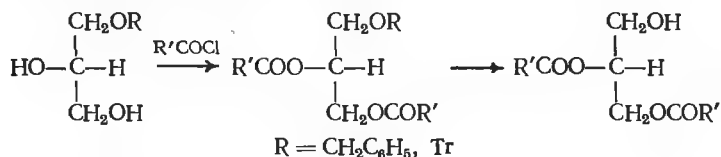
Общие принципы получения 1,2-диацил-*sn*-глицеринов, необходимых для синтеза соединений природной структуры, сводятся к одностадийному или ступенчатому ацилированию 3-О-замещенных производных *sn*-глицерина и последующему удалению защитных групп в условиях, не сопровождающихся миграцией и рацемизацией:



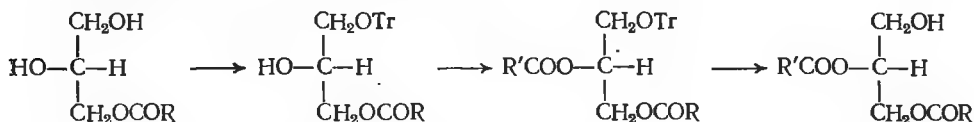
Получение насыщенных 1,2-диацил-*sn*-глицеринов не представляет трудностей и осуществляется преимущественно на основе 3-О-бензил- [79] и 3-О-тритил-*sn*-глицеринов [56] с удалением защитных групп каталитическим гидрированием. Этот метод может быть использован для синтеза ненасыщенных соединений; в этом случае двойные связи защищают с помощью бромирования и последующего дебромирования. Однако в настоящее время метод не имеет широкого применения.

В случае ненасыщенных 1,2-диацил-*sn*-глицеринов исходят из 3-О-тетрагидропиранил-*sn*-глицерина [77] и 3-О- β,β -трихлорэтилкарбоната *sn*-глицерина [74], так как в условиях удаления этих защитных групп (соответственно, мягкий кислотный гидролиз и действие цинка в CH_3COOH или метаноле) сохраняются структура и конфигурация двойных связей. Более перспективным, по-видимому, является применение доступного 3-О- β,β -трихлорэтилкарбоната *sn*-глицерина.

В синтезе других классов нейтральных липидов, в частности нейтральных плазмалогенов, необходимы 2,3-диацил-*sn*-глицерины, которые могут быть получены аналогичным образом, исходя из 1-О-бензил- [82] и 1-О-тритил-*sn*-глицеринов [73]

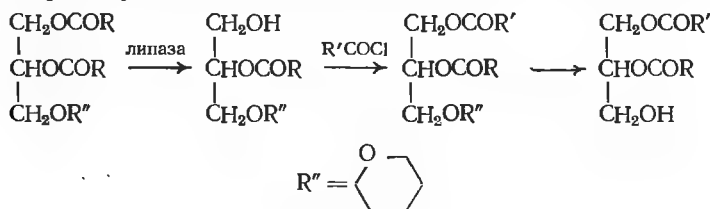


а также из 3-О-ацил-*sn*-глицерина:



Рацемические соединения могут быть получены указанными выше методами и избирательным ацилированием 2-моноголициридов.

Для получения смешанных 1,2-диглицеридов предложены методы, сочетающие химические и ферментативные превращения [68]. Так, при обработке 1,2-ди-О-ацил-3-О-(тетрагидропиранил-2)-глицеринов панкреатической липазой, которая избирательно расщепляет первичную сложн-эфирную группу, образуется 2-О-ацил-3-О-(тетрагидропиранил-2)-глицерин, который далее подвергают последовательно ацилированию и кислотному гидролизу:



Синтез триглицеридов

Триглицериды, содержащие три одинаковых остатка жирных кислот, так называемые простые триглицериды, получают с помощью катализируемой кислотами этерификации глицерина высшими жирными кислотами или их хлорангидридами, а также перэтерификацией метиловых или этиловых эфиров высших жирных кислот и глицерина в присутствии щелочных катализаторов [66]. Однако во всех указанных выше методах, как правило, наряду с триглицеридами образуются моно- и диглицериды. Лучший способ получения простых триглицеридов достаточной степени чистоты основан на ацилировании 1-моноголициридов хлорангидридами высших жирных кислот в присутствии органических оснований.

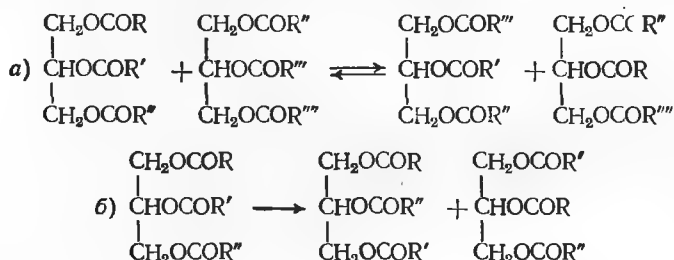
Триглицериды, содержащие остатки двух различных жирных кислот, синтезируют обычно ацилированием моно- и диглицеридов. Симметричные диглицериды этого типа получают этерификацией 1,3-диглицеридов или 2-моноголициридов. Несимметричные триглицериды с двумя различными остатками кислот синтезируют на основе 1-моноголициридов.

Триглицериды, включающие остатки трех различных кислот, получают ацилированием 1,2- и 1,3-диглицеридов, содержащих остатки различных кислот:



В связи с разработкой доступных методов получения триглицеридов оказалось возможным осуществление синтеза глицеридных компонентов растительных и животных жиров: льняного, соевого [83], сафлорового и кукурузного масел, масла бобов какао, молочного жира [84].

Переэтерификация триглицеридов. Молекулы триглицеридов при определенных условиях проявляют тенденцию к переэтерификации. Различают два вида переэтерификации триглицеридов: межмолекулярную (а) и внутримолекулярную (б), например:



Межмолекулярная переэтерификация представляет большой интерес, так как позволяет получать твердые и жидкие жиры с заданными свойствами. Внутримолекулярную переэтерификацию обычно проводят в присутствии различных катализаторов, из которых широкое практическое применение имеют метилат натрия, сплав натрия и калия и другие, позволяющие проводить процесс при относительно низких температурах.

Наибольший интерес для промышленности представляет межмолекулярная переэтерификация глицеридов жиров, в результате которой происходит изменение глицеридного состава жиров, что открывает практические возможности для придания жирам желательных физико-механических свойств. Экспериментальные исследования по изучению процесса межмолекулярной переэтерификации позволили наметить два основных типа реакций: реакции, протекающие с образованием максимального количества ди- и мононасыщенных-мононенасыщенных и мононасыщенных-ди- и мононасыщенных глицеридов и реакции, приводящие к образованию тринасыщенных глицеридов. Реакции первого типа идут при температуре, значительно превышающей температуру плавления исходного жира, до наступления равновесия (ненаправленная переэтерификация).

Реакции второго типа, сопровождающиеся максимальным образованием предельных триглицеридов, обычно проводят при низких температурах.

В настоящее время процесс переэтерификации триглицеридов жиров изучен достаточно полно и нашел практическое применение. Проведена переэтерификация ряда растительных масел: хлопкового и ара-

хисового, оливкового и кокосового, соевого и хлопкового, а также свиного жира и многих других растительных масел и животных жиров.

Частным случаем переэтерификации является ацидолиз триглицеридов и жирных кислот. Эта реакция позволяет снизить температуры плавления природных жиров (бараний и говяжий жиры и др.) путем введения в их молекулы низкомолекулярных насыщенных или высокомолекулярных ненасыщенных жирных кислот. Путем введения насыщенных кислот в жидкие природные жиры можно повысить их температуры плавления и получить жиры с желаемой консистенцией.

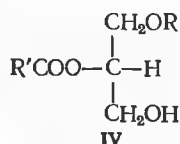
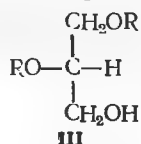
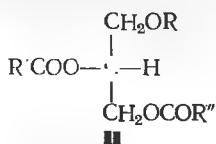
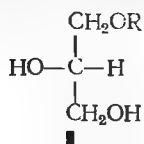
При переэтерификации образуются все теоретически возможные соединения, включая позиционные изомеры.

НЕЙТРАЛЬНЫЕ ЛИПИДЫ С ПРОСТОЙ ЭФИРНОЙ СВЯЗЬЮ

В зависимости от типа присутствующих гидрофобных компонентов нейтральные липиды с простой эфирной связью можно разделить на две биологически связанные группы: производные высших спиртов алифатического ряда (алкильные липиды) и производные высших жирных альдегидов (1-алкенильноэфирные липиды или нейтральные плазмалогены).

Алкильные нейтральные липиды

Различают следующие типы алкильных нейтральных липидов:

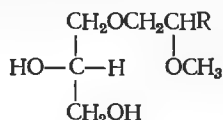


Алкиловые эфиры глицерина (I) выделяют из неомыляемой фракции, получаемой при щелочной обработке нейтральных липидов. В основном они представлены 1-О-гексадециловым, 1-О-октадециловым и 1-О-(октадецен-9-иловым) эфирами глицерина, получившими соответственно тривиальные названия химилового, батилового и селахилового спиртов [85].

В большинстве изученных природных объектов алкиловые эфиры глицерина присутствуют в виде диацильных производных, т. е. соединений со структурой 1-О-алкил-2,3-диацилглицерина II. Эти соединения найдены в различных органах животного организма (костный и головной мозг, сердце, плазма крови, эритроциты, селезенка и т. д.), растительных маслах и микроорганизмах [85]. В значительно больших количествах они присутствуют в жире обитателей моря: морской звезды, иглокожих, моллюсках, различных видах рыб и т. д. [86].

1,2-О-Диалкилглицерины III и 1-О-алкил-2-ацилглицерины IV являются структурными фрагментами фосфолипидов, выделенных из источников животного и бактериального происхождения.

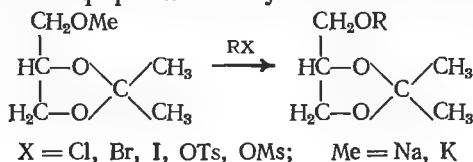
Из печени гренландской акулы кроме указанных алкильных липидов выделены 1-О-(2-метоксIALкил)-глицерины [87]:



Природные алкиловые эфиры глицерина принадлежат к ряду 1-О-алкил-*sn*-глицерина; аналогичную стереохимическую конфигурацию имеют соединения II (1-О-алкил-2,3-диацил-*sn*-глицерин), III (1,2-О-диалкил-*sn*-глицерин) и IV (1-О-алкил-2-ацил-*sn*-глицерин).

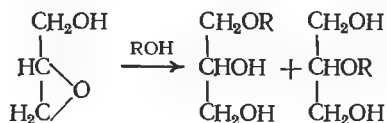
Синтез алкильных нейтральных липидов. Для введения алкильного остатка в молекулу глицерина и его производных разработано несколько методов.

Первый способ, который получил наиболее широкое развитие, основан на взаимодействии замещенных глицератов с алкилгалогенидами [88] или алкиловыми эфирами *n*-толуол- или метансульфокислот:



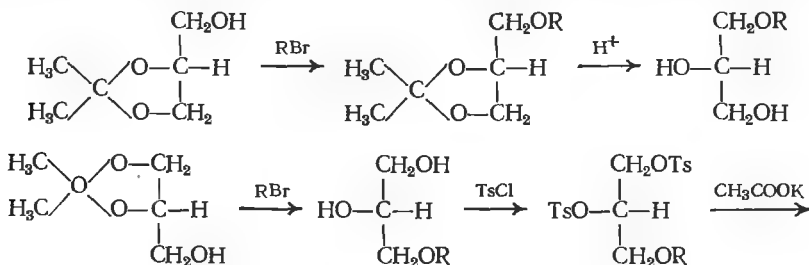
Наиболее удобен препаративный метод, включающий первоначальное получение алкоглята путем азеотропной отгонки воды из смеси замещенного глицерина (предпочтительно изопропилиденглицерина) и едкого кали в подходящем растворителе, и последующее алкилирование бромистым алкилом [89]. Способ алкилирования, использующий реакцию галогензамещенного глицерина с алкоглятами высших спиртов, менее удобен и широкого распространения не получил.

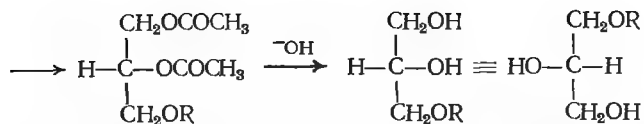
При взаимодействии глицидола с алифатическими спиртами в присутствии кислотных и щелочных катализаторов раскрытие окисного кольца происходит неоднозначно, результатом чего является образование смеси изомерных 1- и 2-алкиловых эфиров глицерина:



При применении защитных групп, используемых в химии глицеридов, можно получить различные представители алкильных липидов.

Для введения алкильного остатка в положение 1 молекулы глицерина обычно проводят алкилирование изопропилиденглицерина с последующим снятием защитной группировки. Для синтеза оптически деятельных природных 1-О-алкил-*sn*-глицеринов используют 2,3-изопропилиден-*sn*-глицерин, получаемый из малодоступного *L*-маннита, или проводят обращение конфигурации 3-О-алкил-*sn*-глицеринов, приготовляемых из 1,2-изопропилиден-*sn*-глицерина [82]:

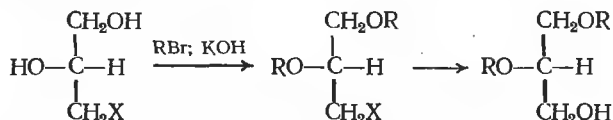




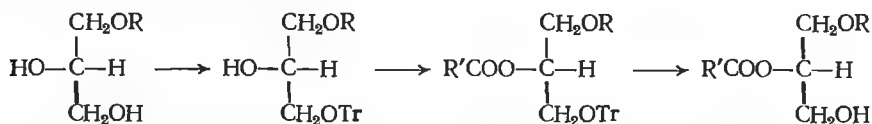
Обращение конфигурации 3-О-алкил-*sn*-глицеринов осуществляют через стадии тозилрования, замены тозилных остатков на ацетоксигруппы и последующего щелочного омыления.

Указанными методами синтезированы природные химилловый, батилловый и селажилловый спирты, при ацилировании которых обычными методами получены соответствующие диацильные производные [90]. Обратный порядок введения заместителей, т. е. алкилирование 2,3-диацил-*sn*-глицеринов, некорректен ввиду возможности миграции ацильных остатков под действием оснований и образования веществ изомерного строения, а также вследствие возможной рацемизации.

Для получения 1,2-диалкил-*sn*-глицеринов алкилируют 3-О-тритил-[91] или 3-О-бензил-*sn*-глицерины, а затем удаляют защитные группы каталитическим гидрированием или кислотным гидролизом (в случае тритильной группы):



Тритильная защита имеет более широкую сферу применения, так как позволяет вводить ненасыщенные алкильные остатки; возможность избирательного введения тритильного остатка в молекулу 1-О-алкил-*sn*-глицерина позволяет осуществить синтез соединений с различными алкильными остатками [91]:



1-О-Алкил-2-ацил-*sn*-глицерины синтезируют ацилированием 1-О-алкил-3-О-тритил-*sn*-глицеринов и последующим удалением защитной группы [91].

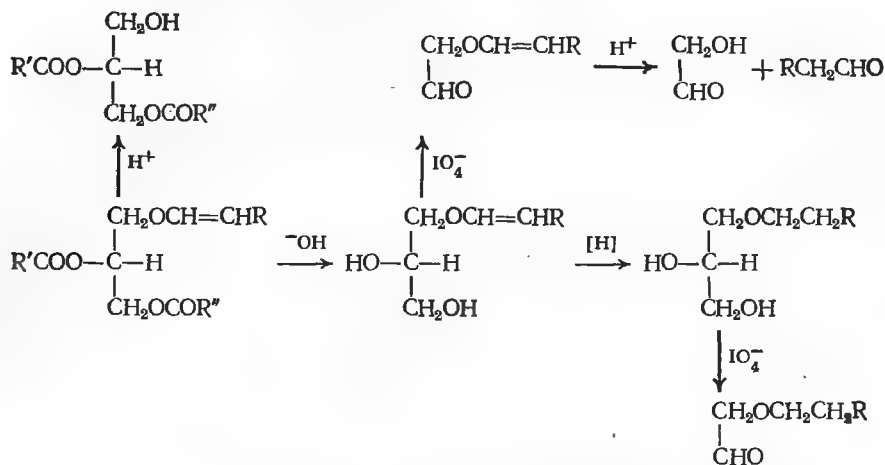
Нейтральные плазмалогены

Отличительной чертой всех плазмалогенов, обуславливающей их выделение в отдельный класс липидов, является наличие в них винильноэфирной группировки $-\text{O}-\text{CH}=\text{CH}-$ [92—94]. Благодаря ей при гидролитическом расщеплении плазмалогенов образуются длинноцепные альдегиды, называемые плазмалями, с чем и связан термин «плазмалогены», или альдегидогенные липиды. Лабильность винильноэфирной группировки отличает плазмалогены от других липидов, содержащих двойную связь в любом ином положении.

Нейтральные плазмалогены были обнаружены впервые в 1960 г. в морской звезде, а позднее в молочном жире, желтке яйца, а также в различных органах и тканях млекопитающих, в том числе и человека (головной и спинной мозг, сердце, жировая ткань и т. д.). Обнару-

жены они в составе хиломикронов (см. стр. 370) и β -липопротеинов человека [85].

Строение нейтральных плазмалогенов было установлено на основании ряда химических превращений:

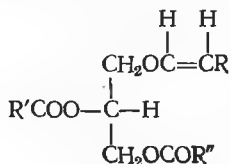


Эти соединения легко гидролизуются кислотами с образованием соответствующих альдегидов и диглицеридов, щелочной гидролиз приводит к алкениловым эфирам глицерина и высшим жирным кислотам. Алкениловые эфиры глицерина с целью установления положения алкенильноэфирной группы подвергали дальнейшим превращениям, что дало возможность установить локализацию алкенильноэфирной группы у первичного спиртового гидроксила.

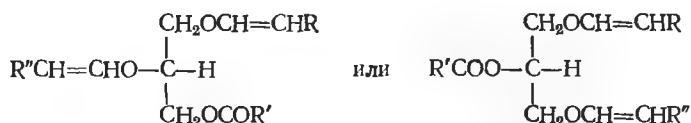
Одним из наиболее существенных вопросов стереохимии плазмалогенов является конфигурация двойной связи в алкенильноэфирной группе. *цис*-Конфигурация двойной связи в плазмалогенах доказана методами ИК-спектроскопии [наличие полос поглощения в области 1260, 1110, 1660 см^{-1} (одиночная полоса) и отсутствие поглощения при 1200 и 930 см^{-1}] [95] и ЯМР-спектроскопии. Природные плазмалогены характеризуются сигналом —ОСН-группы при $\delta=5,87\text{—}5,93$ млн $^{-1}$, имеющим вид дублета с $J=6,5$ Гц; у *транс*-изомеров аналогичный сигнал сдвинут в более слабое поле ($\delta=6,20\text{—}6,28$ млн $^{-1}$, $J=12\text{—}13$ Гц).

Конфигурация асимметрического центра нейтральных плазмалогенов установлена путем сопоставления оптических характеристик гидрированных нейтральных плазмалогенов и синтетических 1-О-алкил-2,3-диацил-*sn*-глицеринов [96, 97]. Это позволило отнести их к одному и тому же ряду соединений.

Таким образом показано, что нейтральные плазмалогены являются *цис*-1-О-(алкен-1-ил)-2,3-диацил-*sn*-глицеринами:

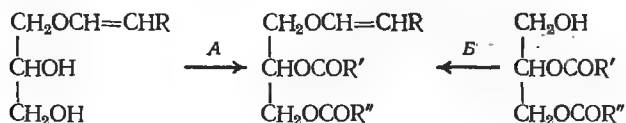


В последние годы обнаружены нейтральные плазмалогены, включающие две алкенильноэфирные группы, положение которых точно не установлено:

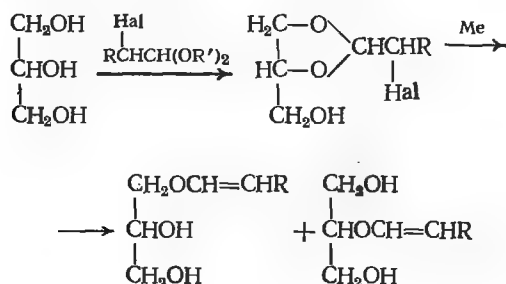


Синтез нейтральных плазмалогенов. Высокая активность *цис*-алкенильноэфирной группировки в реакциях присоединения, исключительная лабильность к действию кислотных агентов и необходимость избирательного введения ее в молекулу полиола (что обуславливает применение специфических защитных групп) крайне затрудняют синтез плазмалогенов.

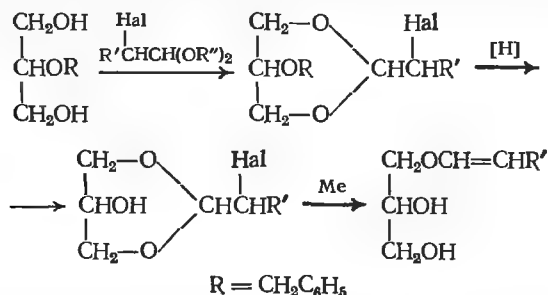
При получении нейтральных плазмалогенов возможны различные вариации в последовательности создания структурных элементов. Один вариант (А) предусматривает первоначальное введение алкенильноэфирной группы в положение 1 молекулы глицерина при защищенных положениях 2 и 3, последующее снятие защиты и ацилирование гидроксильных групп в положениях 2 и 3 образовавшегося 1-алкенилового эфира глицерина. Путь Б предполагает создание алкенильноэфирной группировки на последней стадии синтеза при наличии ацильных остатков в положениях 2 и 3 глицерина:



Большая часть разработанных методов относится к группе А и основана на применении 1-алкениловых эфиров глицерина. Первые успехи в синтезе 1-алкениловых эфиров глицерина достигнуты при использовании циклических α -галогенацеталей глицерина [98, 99], при обработке которых металлами (литий, натрий) происходит элиминирование галогена и расщепление цикла. При использовании несимметричных диоксоланов получают трудно делимую смесь 1- и 2-алкениловых эфиров глицерина:

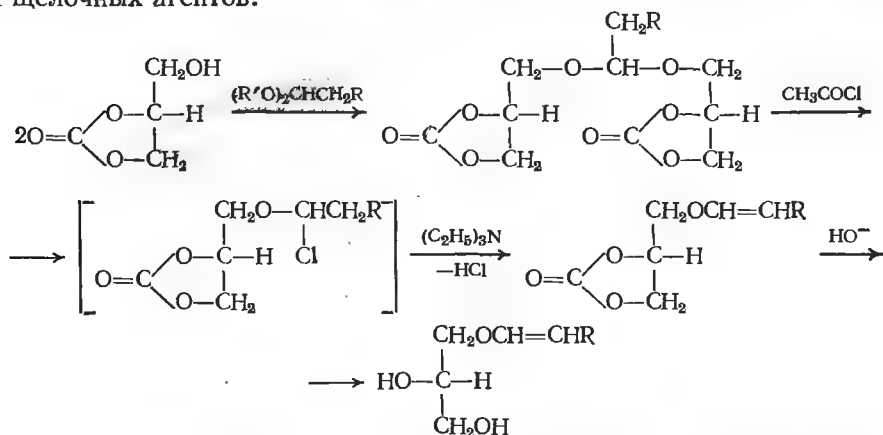


Применение симметричных циклических галогенацеталей позволяет избежать образования 2-изомера, однако этот метод непригоден для получения оптически деятельных соединений:



Указанные методы в настоящее время ограничены областью синтеза диольных плазмалогенов, в частности производных этиленгликоля, и других диолов.

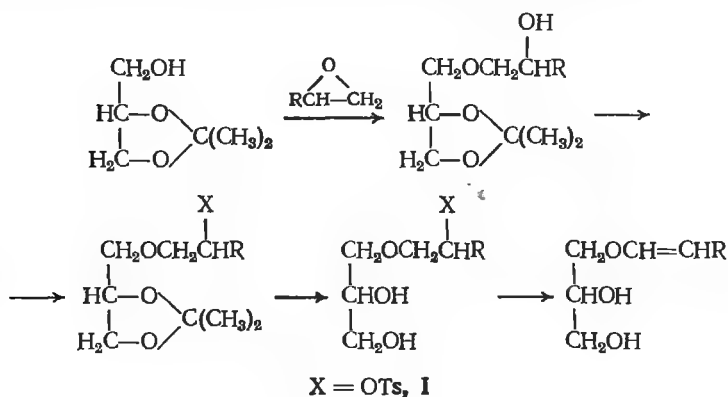
Реализован метод синтеза 1-О-(алкен-1-ил)-*sn*-глицеринов на основе 2,3-циклокарбоната 1-О-(1-хлоралкил)-*sn*-глицерина [100]. 2,3-Циклокарбонат *sn*-глицерина вводят в реакцию переацетализации с диалкилацетальми высших жирных альдегидов. Полученный симметричный ацеталь действием хлористого ацетила превращают в соответствующий α-галогенэфир, который без выделения обрабатывают триэтиламином (отщепление HCl) и далее карбонатную группировку удаляют действием щелочных агентов:



При этом получают *цис*- и *транс*-1-О-(алкен-1-ил)-*sn*-глицерины в отношении 4:1; далее их ацилируют в нейтральные плазмалогены и разделяют на индивидуальные изомеры фракционной кристаллизацией или хроматографией на силикагеле, пропитанном AgNO_3 . Основным достоинством данного метода является преимущественное образование *цис*-изомера при реакции элиминирования, а к числу недостатков следует отнести экспериментальные трудности, обусловленные высокой лабильностью α-галогенэфиров. Широкое применение метода для получения соединений природной конфигурации ограничено дефицитностью исходного 2,3-циклокарбоната *sn*-глицерина.

Осуществленный советскими исследователями [101] синтез алкениловых эфиров глицерина основан на превращениях β-замещенных алки-

ловых эфиров глицерина, которые в отличие от α -галогенэфиров вполне устойчивы. При взаимодействии длинноцепных 1,2-эпоксиалканов с 2,3-изопропилиденглицерином в присутствии щелочных катализаторов получают 1-О-(2-оксиалкил)-2,3-изопропилиденглицерины. Далее осуществляют последовательное замещение оксигруппы в оксиалкильном остатке на иод (или введение тозилльной группы), снятие кетальной защиты мягким кислотным гидролизом и отщепление иодистоводородной или *n*-толуолсульфокислоты при действии *трет*-бутилата калия в среде *трет*-бутилового спирта. Подбором экспериментальных условий удается провести реакцию элиминирования только в направлении образования двойной связи, сопряженной с простой эфирной [102]:

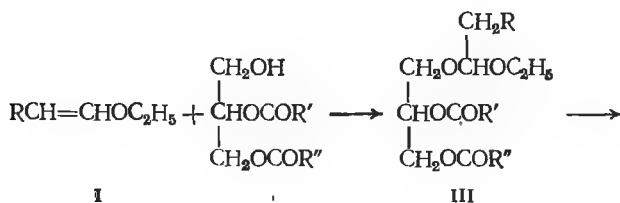


Соотношение *цис*- и *транс*-изомеров зависит от условий реакции элиминирования.

В настоящее время для получения 1-алкениловых эфиров глицерина могут быть использованы методы, основанные на элиминировании галогеноводорода от α - и β -галогенэфиров.

Для синтеза нейтральных плазмалогенов с успехом использованы методы, основанные на превращениях симметричных [103] и несимметричных [104] линейных ацеталей 2,3-диацилглицерина и высших альдегидов алифатического ряда.

Несимметричные ацетали III, полученные при взаимодействии алкенилэтиловых эфиров I с диглицеридами II в присутствии кислотных катализаторов, при нагревании с сульфосалициловой кислотой давали нейтральные плазмалогены VI. Изучение этой реакции показало, что первоначально происходит диспропорционирование несимметричного ацетала III с образованием двух симметричных ацеталей — диалкилацетала IV и ди-(2,3-диацилглицеро)-ацетала V, а далее — отщепление молекулы диглицерида от ацетала V с образованием плазмалогена:



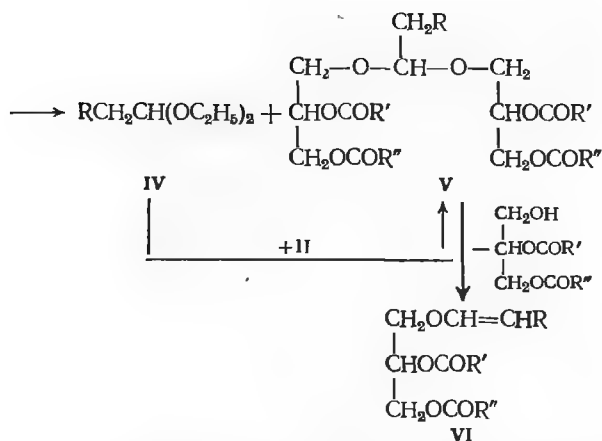


Схема была модифицирована путем направленного получения симметричных ацеталей V с помощью реакции переацетализации диалкилацеталей IV с диглицеридами II. Это позволило сократить число стадий и увеличить общий выход нейтральных плазмалогенов.

При реализации предложенной схемы необходимо учитывать возможность ацильной миграции как на стадии получения ацеталей, так и при их разложении. Однако проведение этих процессов в тщательно контролируемых условиях (температурный режим, продолжительность реакции, количество катализатора) позволяет свести к минимуму ацильную миграцию. По данному методу получают *цис*- и *транс*-изомеры в соотношении 1 : 1.

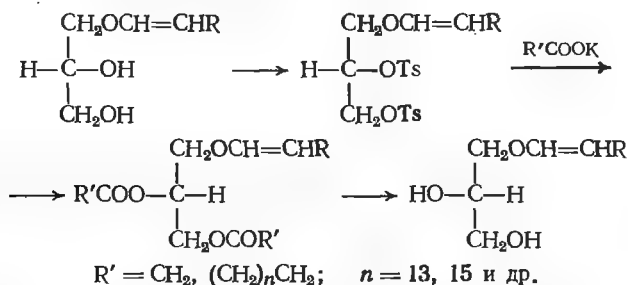
Получение альдегидогенных липидов природной конфигурации сопряжено с решением ряда стереохимических проблем: созданием *цис*-1-алкенильноэфирной группировки и получением соединений ряда 1-О-(алкен-1-ил)-*sn*-глицеринов. Для решения первой проблемы наиболее заманчивым является стереоспецифический синтез. В частности, для этой цели была исследована реакция Виттига, которая однако не дала положительных результатов. Неудачной оказалась попытка изомеризации γ -замещенных аллиловых эфиров изопропилиденглицерина под действием сильных оснований, а также попытки проведения стереоспецифичного элиминирования в ряду β -замещенных алкиловых эфиров глицерина с помощью пространственно затрудненных оснований. Перспективным казалось использование для стереоспецифичного синтеза плазмалогенов замещенных ацетиленовых эфиров глицерина и его производных. Однако трудности получения этих эфиров и их высокая лабильность не позволили реализовать эту возможность. Таким образом, все многочисленные попытки стереоспецифического синтеза плазмалогенов оказались безуспешными, а реакции элиминирования, как уже указывалось, приводят к образованию смеси *цис*- и *транс*-изомеров.

Проблема получения 1-алкениловых эфиров глицерина и его производных с *цис*-конфигурацией двойной связи была успешно решена с помощью метода каталитической изомеризации [105]. Удобным объектом изомеризации, осуществляемой в присутствии каталитических количеств селена или ацетата ртути, являются *транс*-1-О-(алкен-1-ил)-2,3-диацил-*sn*-глицерины; в образующейся равновесной смеси изомеров содержится 30—45% *цис*-формы. Разделение стереоизомеров и повторная изомеризация позволяют осуществить полное превращение *транс*-

форм в природные *цис*-соединения. Метод применим к оптически активным соединениям, так как в ходе его не наблюдается рацемизации.

Вторая стереохимическая проблема в синтезе плазмалогенов связана с тем обстоятельством, что применение в качестве оптически активного сырья *D*-маннита, широко используемого в химии липидов, приводит к 3-О-(алкен-1-ил)-*sn*-глицеринам — антиподам природных соединений, что вызывает необходимость проведения вальденовского обращения либо на стадии получения алкениловых эфиров глицерина, либо при получении производных глицерина, используемых в их синтезе.

Для обращения конфигурации 1-алкениловых эфиров глицерина с успехом использован метод вальденовского обращения, основанный на взаимодействии эфиров сульфокислот с калиевыми солями карбоновых кислот. В связи с лабильностью 1-алкенильноэфирной группировки реакцию проводили в среде биполярных апротонных растворителей (диметилсульфоксид, диметилформамид) [105]:

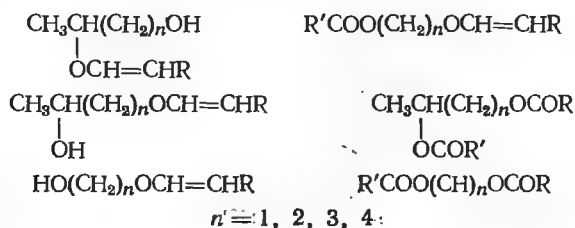


При введении остатков высших жирных кислот наряду с обращением конфигурации происходит одновременно синтез нейтральных плазмалогенов природной оптической конфигурации, т. е. из 3-О-(алкен-1-ил)-*sn*-глицерина можно получить 1-О-(алкен-1-ил)-2,3-диацил-*sn*-глицерины с выходом ~70%.

Используя описанные методы создания 1-алкенильноэфирной группировки и указанные стереохимические превращения, в настоящее время можно синтезировать нейтральные плазмалогены природной конфигурации с различным набором 1-алкенильноэфирных и жирнокислотных остатков.

НЕЙТРАЛЬНЫЕ ДИОЛЬНЫЕ ЛИПИДЫ

В семенах различных растений, жирах млекопитающих, морских организмов, рыб и дрожжах обнаружены 1-алкенильноэфирные и ацильные производные различных диолов состава C_3 — C_4 , для которых предложено общее название «диольные липиды» [106]. В морских организмах (например, в морской звезде) обнаружены также алкиловые эфиры диолов:

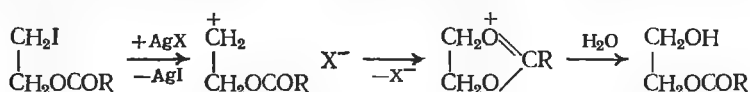


Диольные липиды по химическим свойствам и хроматографическому поведению мало отличаются от глицеридов и могут быть обнаружены лишь с помощью газо-жидкостной и тонкослойной хроматографии, поскольку они присутствуют в незначительных количествах.

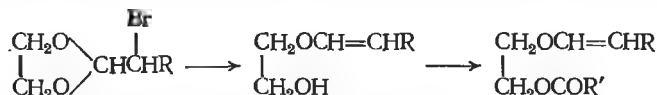
Моноацильные производные диолов получают непосредственным ацилированием их, однако при этом образуется примесь диацильного производного. Лучшие результаты достигнуты при использовании монозамещенных производных диолов, например, ацилированием тритильного производного диола и последующим снятием защиты:



Моноацилгликоли могут быть получены также обработкой 1-иод-1-дезоксиглицерина водноспиртовым раствором AgNO_3 или AgNO_2 [107]:

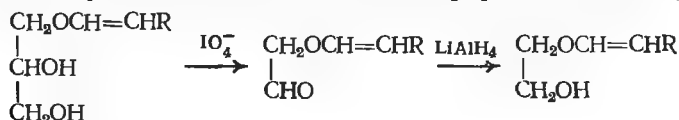


Ацилированием моноацилгликолей получают смешанные диацильные производные гликолей. Нейтральные плазмалогены диольного типа получают, исходя из 2-(1-бромалкил)-1,3-диоксоланов [108]:



Образующуюся смесь *цис*- и *транс*-изомеров разделяют хроматографией на силикагеле, импрегнированном AgNO_3 .

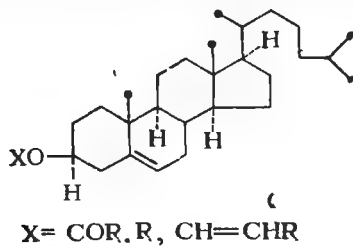
Нейтральные диольные плазмалогены синтезируют также путем окислительного расщепления природных 1-О-алкениловых эфиров глицерина с последующим восстановлением эфиральдегидов [109]:



Аналогично синтезируют алкиловые эфиры диолов путем деструкции алкиловых эфиров глицерина.

ЭФИРЫ ХОЛЕСТЕРИНА

Холестерин является важным компонентом животных тканей. Так, вещество мозга содержит до 7% холестерина в расчете на сухую массу. Основная часть холестерина присутствует в связанном состоянии в виде ацильных, алкильных и алкенильноэфирных производных:



Наиболее распространены эфиры высших жирных кислот, содержание которых в плазме крови составляет 70% от общего содержания холестерина, а в надпочечных железах — 90%.

Наряду с насыщенными жирными кислотами (пальмитиновой и стеариновой) в составе эфиров холестерина обнаружены ненасыщенные кислоты: олеиновая, линолевая, линоленовая и другие.

Эфиры холестерина получают этерификацией холестерина высшими жирными кислотами или их хлорангидридами.

Холестерилалкиловые и холестерилалкен-1-иловые эфиры обнаружены лишь в сердечной мышце быка и свиньи в концентрациях значительно меньших, чем эфиры высших жирных кислот. Основным спиртом является гексадециловый, а альдегиды представлены пальмитиновым и стеариновым.

ГЛИКОЛИПИДЫ

Гликолипидами называют соединения, молекулы которых содержат липидный и углеводный фрагменты, соединенные ковалентной связью. Гликолипиды охватывают разнообразные по структуре соединения и представлены в различных организмах животного, растительного и бактериального происхождения. В последнее время значительно возрос интерес к данному классу соединений, что обусловлено их важной биологической ролью. Полагают, что гликолипиды выполняют как метаболические, так и структурные функции. Они входят в состав клеточных и внутриклеточных мембран, обладают антигенными свойствами [110].

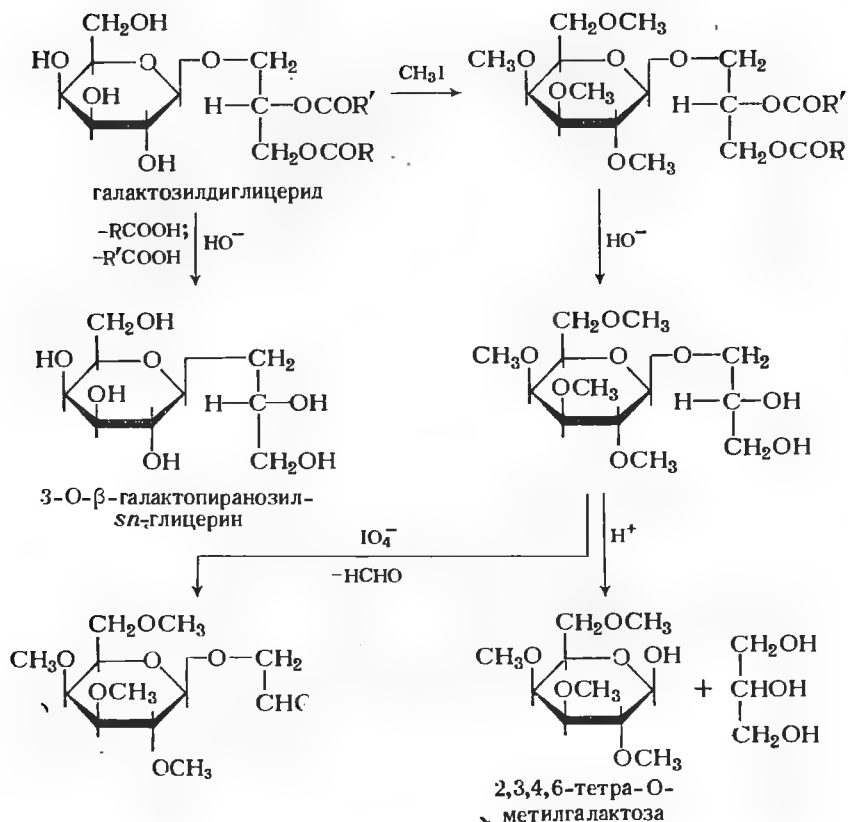
В данном разделе описаны лишь нейтральные гликолипиды и некоторые их производные (сфингогликолипиды рассмотрены в разделе «Сфинголипиды», гликофосфолипиды — в разделе «Фосфолипиды»).

Моно- и дигликозилдиглицериды

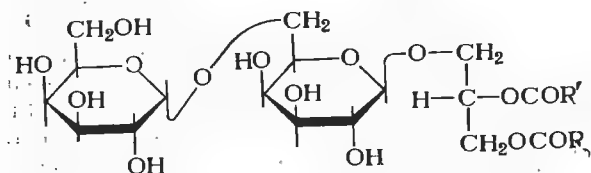
В растительных источниках (зерна пшеницы, кукурузы, красные морские водоросли, фотосинтезирующие водоросли *Chlorella*, зеленые листья ряда растений и т. д.), а позднее и в животных тканях (головной мозг) и в некоторых микроорганизмах обнаружены моно- и дигликозилдиглицериды, основным углеводным компонентом которых является галактоза. Строение данных соединений установлено на основании ряда химических превращений, используемых в химии углеводов [111].

В продуктах щелочного гидролиза моногликозилдиглицеридов были обнаружены жирные кислоты (2 моль на 1 моль липида) и 3-О-β-D-галактопиранозил-*sn*-глицерин. В результате исчерпывающего метилирования и последующего щелочного деацилирования был получен тетраметилгалактозилглицерин, кислотный гидролиз которого привел к образованию глицерина и 2,3,4,6-тетра-О-метилгалактозы. При окислении этого соединения периодной кислотой образуется соответствующий альдегид. С помощью аналогичных превращений устанавливалось строение дигликозилдиглицеридов.

Конфигурация гликозидных связей в моно- и дигалактозилдиглицеридах установлена с помощью гидролиза специфичными ферментами (α- и β-гликозидазы). Конфигурация глицеридной части их молекулы определена на основании сопоставления оптических свойств продуктов их щелочного деацилирования с соответствующими синтетическими соединениями.



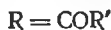
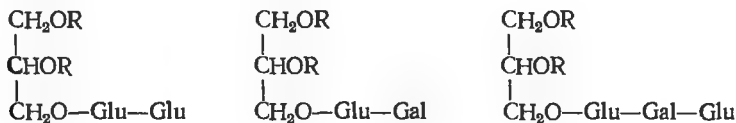
В результате указанных превращений для моно- и дигалактозилглицеридов предложены соответственно строение 1,2-ди-О-ацил-3-О-(β-*D*-галактопиранозил)-*sn*-глицерина (галактозилдиглицид) и 1,2-ди-О-ацил-3-О-[α-*D*-галактопиранозил-(1→6)-β-*D*-галактопиранозил]-*sn*-глицерина



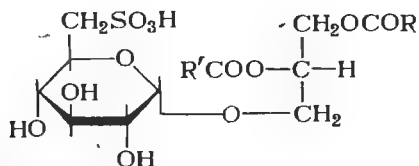
В составе данных гликолипидов присутствуют в значительных количествах ненасыщенные кислоты (олеиновая, линолевая и другие). Из головного мозга наряду с диацильной формой гликолипида выделен 1-О-алкил-2-О-ацил-3-О-(β-*D*-галактопиранозил)-*sn*-глицерин.

Гликозиды, близкие по структуре к дигалактозилдиглицидам, обнаружены в липидах многих грамположительных бактерий. Так, различные штаммы стафилококков образуют диглюкозилдиглициды,

а пневмококки и лактобациллы — галактозилглюкозилдиглицериды и глюкозилгалактозилглюкозилдиглицериды:

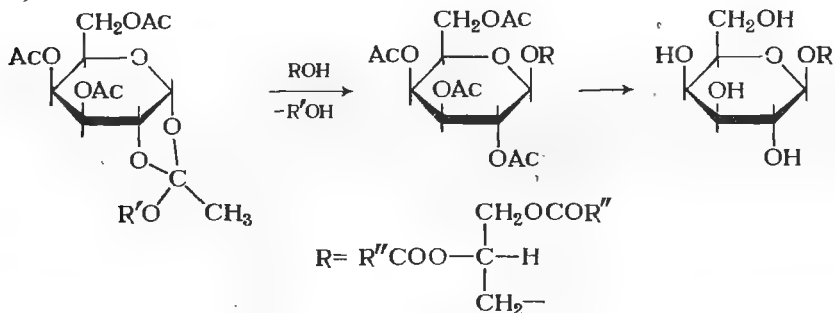


Моногликозилдиглицидам структурно родственны сульфогликозилдиглициды, обнаруженные в высших растениях, водорослях и фотосинтезирующих микроорганизмах. Они имеют структуру 1,2-ди-О-ацил-3-О-(6-сульфо-6-дезоксид- α -D-глюкопиранозил)-*sn*-глицерина:



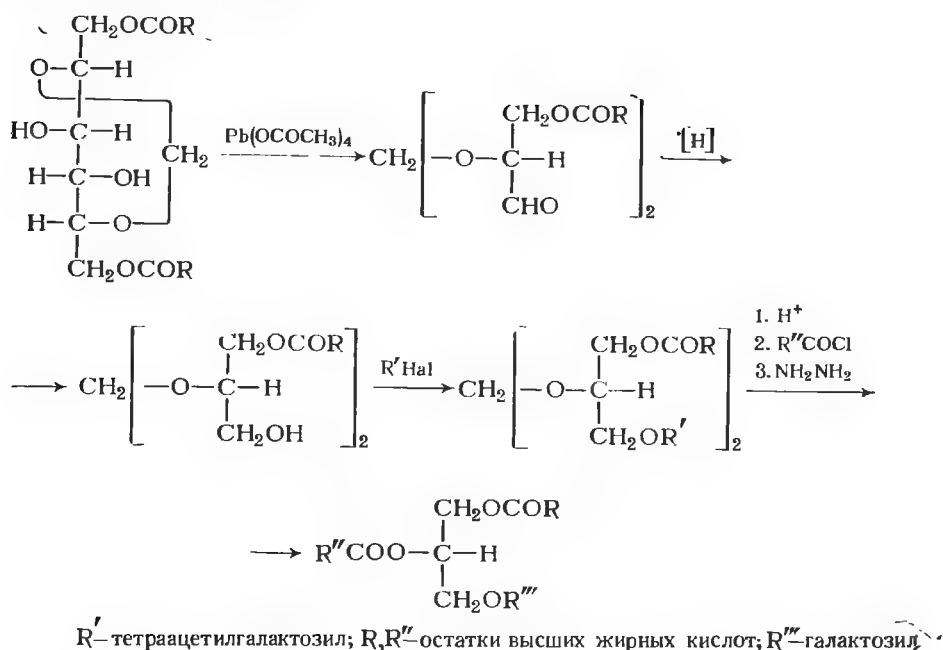
α -Конфигурация гликозидной связи установлена с помощью ЯМР-спектров, стереохимическая конфигурация глицеридной половины молекулы определена на основании образования 1-*sn*-глицериновой кислоты при кислотном гидролизе окисленного сульфолипида.

Для синтеза моно- и дигликозилдиглициридов использованы методы гликозилирования, применяемые в химии углеводов (реакция Кенинга — Кнорра, ортоэфирный метод). Так, синтез 1,2-ди-О-ацил-3-О-(β-D-галактопиранозил)-sn-глицерина осуществлен ортоэфирным методом [112]:



Синтез галактозилдиглициридов осуществлен также на основе 1,6-ди-О-ацил-2,5-О-метилен-*D*-маннита путем окисления его тетраацетатом свинца, восстановлением полученного альдегида и гликозилрованием образующегося при этом спирта защищенным галактозилгалогенидом по методу Кенигса — Кнорра. Последующий гидролиз, ацилирование и удаление ацильных групп приводят к 1,2-ди-О-ацил-3-О-(β -*D*-галакто-

пиранозил)-*sn*-глицерину [113]:



Рассмотренные гликолипиды являются важными компонентами хлоропластов растений и выполняют функции структурных элементов в фотосинтетических органеллах, где принимают активное участие в фотосинтезе.

Гликолипиды бактерий

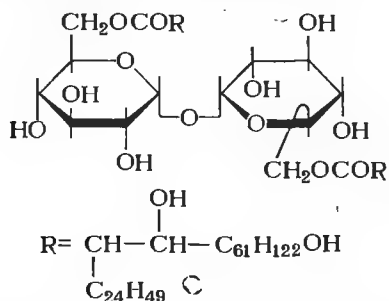
Гликолипиды бактерий представляют собой обширную группу соединений, сильно различающихся по свойствам и строению. Наряду с гликопротеинами они обладают антигенными свойствами и, по-видимому, определяют серологическую характеристику микроорганизма.

Основными углеводными компонентами наиболее изученных гликолипидов кислотоустойчивых бактерий являются *D*-арабиноза, *D*-глюкоза, *D*-манноза, *D*-рамноза, *O*-метирированные дезоксигексозы, трегалоза. Липидная часть гликолипидов кислотоустойчивых бактерий обычно представлена разветвленными высокомолекулярными жирными кислотами.

Для сложных эфиров углеводов и высокомолекулярных жирных кислот принято название микрозиды. Наиболее изученным представителем микрозидов является высокотоксичный гликолипид, выделенный из вирулентных штаммов *E. tuberculosis* и названный «корд-фактором», что связано с его способностью агрегироваться в длинные нити. «Корд-фактор» представляет собой воскообразное вещество, т. пл. 39—40 °C, $[\alpha]_D^{20} + 30^\circ$.

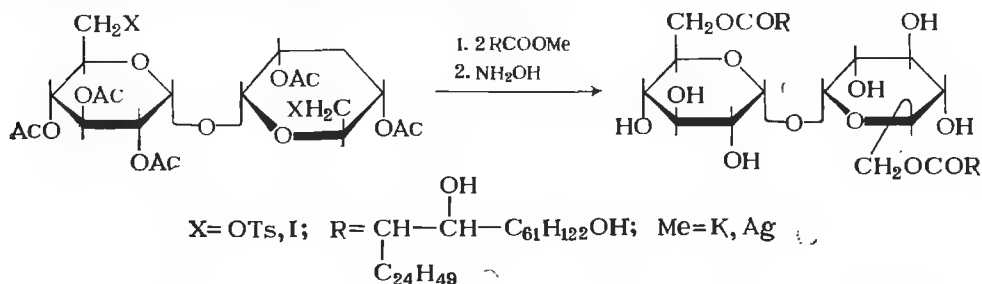
При щелочном гидролизе этого соединения получены миколовая кислота (2 моль) и невосстанавливающий дисахарид, кислотный гидролиз которого приводит к *D*-глюкозе (2 моль). Таким образом установлено,

что углеводная половина «корд-фактора» является трегалозой, а сам «корд-фактор» — 6,6'-димиколатом трегалозы:



Положение остатков миколовых кислот установлено по результатам метилирования и последующего кислотного и щелочного гидролиза.

Первый синтез «корд-фактора» осуществлен этерификацией трегалозы хлорангидридом миколовой кислоты (2 моль), но при этом наряду с нужным продуктом возникали 6-моно- и 2,6,6'-тримиколаты трегалозы. Более целесообразно направленное введение остатков миколовой кислоты в молекулу защищенной трегалозы:



Это достигается взаимодействием 2,3,4,2',3',4'-гекса-О-ацетил-6,6'-диод(или тозил)-трегалозы с серебряной или калиевой солью миколовой кислоты с последующим деацетилированием при действии гидроксиламина; возможно непосредственное ацилирование 6,6'-ди-О-тозил-трегалозы калиевой солью миколовой кислоты.

Из различных штаммов бактерий выделены «корд-факторы», отличающиеся структурой миколовых кислот (кориномиколовая, α-кориновая, β-кориновая и т. д.). «Корд-факторы» являются биологически активными веществами, они вызывают частичное ингибирование ферментов, например сукцинатдегидрогеназы, обладают некротическим действием и увеличивают скорость развития туберкулезных бацилл у подопытных животных.

При исследовании липидов различных штаммов микробактерий были обнаружены специфические гликолипиды — микозиды, которые определяют серологический тип бактерий. Известны три типа микозидов: микозид А, характерный для так называемых атипичных фитохромогенных штаммов, микозид В, присущий штаммам туберкулеза рогатого скота, и микозид С — штаммам туберкулеза птиц.

Микозид В содержит в качестве углеводной компоненты 2-О-метил-D-рамнозу, связанную β-гликозидной связью с фенольным гидроксильным длинноцепным фенолгликолем состава $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_4$, гидроксильные группы

$$\begin{array}{c}
 \text{CH}_3 \\
 | \\
 \text{---} \text{O} \text{---} \\
 / \quad \backslash \\
 \text{HO} \quad \text{CH}_3\text{O} \\
 | \quad | \\
 \text{---} \text{O} \text{---} \text{C}_6\text{H}_4 \text{---} \text{CH}_2(\text{CH}_2)_x \text{CH}(\text{CH}_2)_{y-1} \text{CH}_2 \text{COO} \left[\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ | \\ \text{CHCH}_2 \end{array} \right]_3 (\text{CH}_2)_{18} \text{CH}_3 \\
 | \qquad | \qquad | \qquad | \\
 \text{OH} \quad \text{CH}_3\text{O} \quad \text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COO} \quad \text{OCH}_3
 \end{array}$$

$x + y = 16$

$$\begin{array}{c}
 \text{C}_{42}\text{H}_{85}\text{CONH}-\text{CH}-\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5 \\
 | \\
 \text{CO} \\
 | \\
 \text{NH} \\
 | \\
 \text{CH}-\text{CONH} \\
 | \\
 \text{CH}-\text{O}-\text{CH} \\
 | \quad | \\
 \text{CH}_3 \quad \text{CH}_3 \\
 | \quad | \\
 \text{CH}-\text{CONH}-\text{CH}-\text{CONH}-\text{CH} \\
 | \quad | \quad | \\
 \text{CH}_3 \quad \text{CHOH} \quad \text{CH}_3 \\
 | \quad | \quad | \\
 \text{CH}_3 \quad \text{CH}_3 \quad \text{CH}_3 \\
 | \quad | \quad | \\
 \text{CH}-\text{CONH}-\text{CH}-\text{CONH}-\text{CH} \\
 | \quad | \quad | \\
 \text{CH}_3 \quad \text{CHOH} \quad \text{CH}_3 \\
 | \quad | \quad | \\
 \text{CH}_3 \quad \text{CH}_3 \quad \text{CH}_3
 \end{array}$$
$$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{RO}-\text{P}-\text{OR}' \\ | \\ \text{O}^- \end{array}$$

264

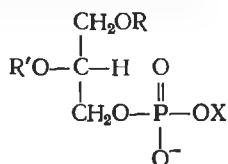
Т а б л и ц а 16. Типы природных глицерофосфолипидов

Название	Гидрофильный заместитель X	Гидрофобные заместители	
		R	R'
Фосфатидовые кислоты	H	ацил	ацил
Фосфатидальные кислоты	H	алкил	алкил
Фосфатидилхолины (лецитины)	$\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$	<i>цис</i> -алкен-1-ил	ацил
Фосфатидальхолины (лецитин-плазмалогены)	$\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$	ацил	алкил
Фосфатидил-N,N-диметилэтаноламины	$\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}^+(\text{CH}_3)_2$	алкил	ацил
Фосфатидил-N-метилэтаноламины	$\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2\text{CH}_3$	ацил	ацил
Фосфатидилэтаноламины (кефалины)	$\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_3^+$	ацил	ацил
Фосфатидальэтаноламины (кефалин-плазмалогены)	$\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_3^+$	алкил	алкил
N-Ацилфосфатидилэтанол-аминны	$\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCOR}''$	<i>цис</i> -алкен-1-ил	ацил
N-Ацетилфосфатидальэтанол-амины	$\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCOCH}_3$	ацил	ацил
β -Метиллецитины	$\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$	<i>цис</i> -алкен-1-ил	ацил
Фосфатидилсерины	CH_2CHCOOH $+\text{NH}_3$	ацил	ацил
Фосфатидальсерины	CH_2CHCOOH $+\text{NH}_3$	ацил	ацил
Фосфатидилтреонины	$\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CHCOOH}$ $+\text{NH}_3$	<i>цис</i> -алкен-1-ил	ацил
Фосфатидилглицерины	$\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{OH}$	ацил	ацил
Фосфатидальглицерины	$\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{OH}$	алкил	алкил
О-Эфиры фосфатидилглицерина и аминокислот (липоаминокислоты)	$\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{OCOCHRNH}_2$	<i>цис</i> -алкен-1-ил	ацил
Фосфатидилглицерофосфаты	$\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{OPO}_3\text{H}_2$	ацил	ацил
Дифосфатидилглицерины (кардиолипины)	$\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{OPO}_2\text{CH}_2$ OH -O-CHOCOR' CH ₂ OCOR''	ацил	ацил
Гликофосфолипиды	—CH ₂ CH(OH)CH ₂ O—дисахарид дисахарид—диглицерид	ацил H	ацил H

Название	Гидрофильный заместитель X	Гидрофобные заместители	
		R	R'
Фосфатидилмиоинозиты (монофосфоинозитиды)	остаток миоинозита	ацил	ацил
Фосфатидадьмиоинозиты	остаток миоинозита	цис-алкен-1-ил	ацил
Фосфатидьлмиоинозит-4-фосфаты (дифосфоинозитиды)	остаток миоинозит-4-фосфата	ацил	ацил
Фосфатидилмиоинозит-4,5-дифосфаты (трифосфоинозитиды)	остаток миоинозит-4,5-дифосфата	ацил	ацил
Фосфатидилмиоинозитдиманнозиды	миоинозитдиманнозил	ацил	ацил

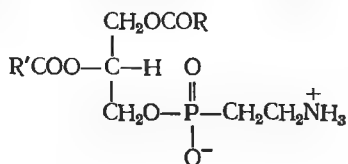
Все фосфолипиды в зависимости от входящего в их состав полиола целесообразно разделить на глицерофосфолипиды, диольные фосфолипиды и сфингофосфолипиды (см. стр. 338).

Подобно другим классам липидов, глицерофосфолипиды характеризуются большим разнообразием гидрофобных и гидрофильных компонентов. В основу их классификации кладется, как правило, присутствующий гидрофильный компонент; глицерофосфолипиды рассматривают как производные фосфатидовой ($R=\text{ацил}$) или фосфатидалевой ($R=\text{CH=CHR''}$) кислот:



Основные типы глицерофосфолипидов представлены в табл. 16.

Из природных источников выделены также фосфолипиды, содержащие остаток замещенной фосфоновой кислоты, — фосфонолипиды:



СВОЙСТВА ФОСФОЛИПИДОВ

Физические свойства фосфолипидов

Молекулы фосфолипидов имеют ряд интересных физических свойств, знание которых необходимо для понимания их биологического поведения.

Фосфолипиды, подобно нейтральным липидам, могут существовать в виде нескольких полиморфных форм (A, B, C). Переходы от одной полиморфной формы к другой могут происходить при нагревании или

охлаждении, а также при кристаллизации из различных растворителей [14].

Фосфолипиды при нагревании плавятся в две стадии: через промежуточное образование так называемых жидких кристаллов. Это явление обусловлено тем, что расплавление углеводородной части молекулы может происходить при более низкой температуре, чем расплавление всей молекулы, так как силы взаимодействия между углеводородными цепями значительно слабее, чем силы взаимодействия между ионными группами. Температуры, соответствующие переходу «кристаллы — жидкие кристаллы», изменяются в зависимости от характера присутствующих в молекуле фосфолипида жирнокислотных остатков. Введение *цис*-ненасыщенных жирнокислотных остатков, как правило, понижает температуру перехода, по сравнению с насыщенными. Так, природные фосфолипиды митохондрий содержат высоконенасыщенные жирнокислотные остатки и при комнатной температуре находятся в жидкой кристаллической фазе (т. е. расплавлена область углеводородных цепей). Присутствие воды также понижает температуру перехода.

Наличие в молекуле фосфолипидов неполярных (гидрофобных) участков и полярных (гидрофильных) областей определяет их поведение в водных растворах. На поверхности воздух — вода фосфолипиды образуют мономолекулярный слой, в котором полярные части направлены в воду, а гидрофобные углеводородные цепи — в воздух (рис. 24, а).

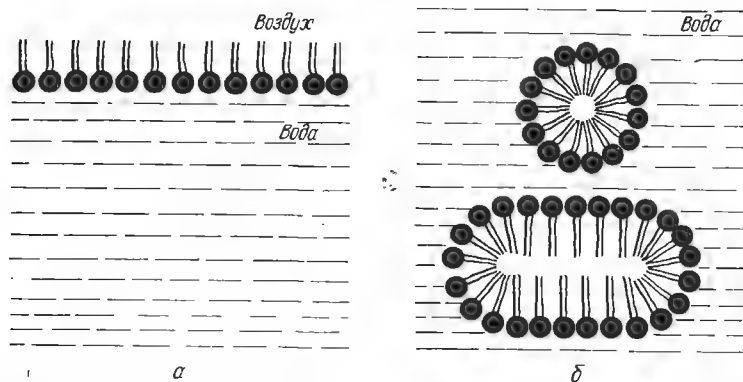


Рис. 24. Устойчивые системы фосфолипид—вода:
а — на границе вода — воздух; б — в воде.

В водных растворах в зависимости от концентрации фосфолипиды образуют различные упорядоченные структурные элементы [114]. При низкой концентрации, так называемой мицеллярной концентрации, наблюдается образование мицелл — компактных сферических частиц, в которых полярные головки образуют внешний слой, а гидрофобные — внутренний (24, б). При увеличении концентрации фосфолипидов мицеллы группируются с образованием длинных цилиндров с гексагональной жидкокристаллической решеткой (рис. 24, б). При еще более высокой концентрации фосфолипидов образуется второй тип жидкокристаллической фазы, так называемая ламеллярная (слоистая) структура, которая состоит из бимолекулярных слоев липидов, разделяемых слоями воды. Точка перехода от гексагональной фазы к ламеллярной в опреде-

ленной степени зависит также от состава фосфолипидов, температуры и ионного состава водной фазы.

В жидкокристаллической фазе в воде фосфолипиды способствуют растворению ряда малорастворимых веществ, например, фосфатидилхолин яйца способствует растворению холестерина (до 30%) [16].

В молекулах фосфолипидов присутствуют различные ионные группы:

	Фосфолипиды
PO_3^{2-}	Фосфатидовая кислота
PO_4^-	Монофосфоинозитид, кардиолипин
$\text{PO}_4^-, \overset{+}{\text{N}}(\text{CH}_3)_3$	Фосфатидилхолин, сфингомиелин, лизофосфатидилхолин
$\text{PO}_4^-, \overset{+}{\text{NH}}_3$	Фосфатидилэтаноламин
$\text{PO}_4^-, \overset{+}{\text{NH}}_3, \text{COO}^-$	Фосфатидилсерин

Фосфолипиды, содержащие первичную и вторичную фосфатные группы, являются сильными кислотами. Так, фосфатидовая кислота имеет pK_1 3,9 и pK_2 8,3, а у монофосфоинозиотида и кардиолипина $\text{pK} < 2$. В зависимости от pH среды фосфолипиды существуют в различной ионной форме. Фосфатидилэтаноламин и фосфатидилсерин имеют отрицательный заряд при pH 7,5, изoeлектрическая точка фосфатидилхолина, лизофосфатидилхолина и сфингомиелина располагается в области pH 3,5—10.

Молекулы лецитина образуют структуры цвиттерионного типа в широкой области pH. Присутствие функциональных групп, таких, как PO_4^- , $+\text{NH}_3$ и COO^- в фосфатидилсерине обуславливает его способность к образованию хелатных ионов с Ca^{2+} и Mg^{2+} .

Наличие электростатически заряженных групп в полярных частях молекул фосфолипидов обеспечивает их взаимодействие с противоположно заряженными ионами, находящимися в водной среде; результатом этого взаимодействия является возникновение определенного электрического потенциала, что важно для мембранных процессов.

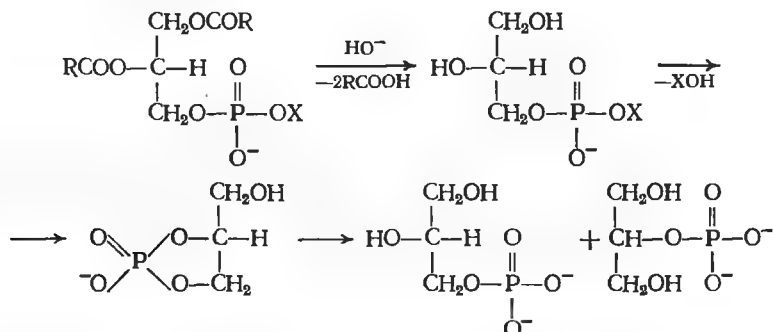
Считают, что все фосфолипиды нерастворимы в ацетоне, лецитины растворимы в спирте, а фосфатидилэтаноламины и фосфатидилсерины в спирте нерастворимы. Однако это обобщение не совсем правильно, поскольку растворимость полярного липида в органических растворителях зависит от длины цепи и степени ненасыщенности (т. е. от соотношения гидрофобных и гидрофильных областей). Фосфатидилхолины, углеводородные цепи которых содержат менее 10 атомов углерода, хорошо растворимы в ацетоне, соединения с более длинной углеводородной цепью нерастворимы. Аналогично, растворимость фосфатидилхолинов в спирте уменьшается с увеличением длины цепи гидрофобных остатков. Кроме того, на растворимость липидов может оказывать влияние присутствие других типов липидов.

В полярных растворителях, таких, как спирт, фосфолипиды мономерны, в неполярных растворителях, например в бензоле, они образуют мицеллярные агрегаты с различной молекулярной массой (50 000 и более). В этом случае полярные группы направлены внутрь частицы, а гидрофобные цепи наружу.

Химические свойства фосфолипидов

Фосфолипиды проявляют химические свойства, типичные для диэфиров фосфорной кислоты, особенно в условиях гидролитического расщепления [115]. При pH 7 фосфолипиды устойчивы, лишь в незначительной степени происходит гидролиз сложноэфирных связей, однако в кислой и щелочной средах они достаточно быстро гидролизуются.

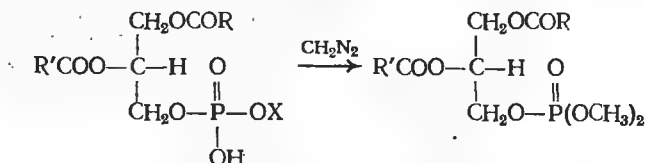
При щелочном гидролизе фосфолипидов первоначально образуются жирные кислоты и замещенные глицерофосфаты. Однако в последних фосфоэфирная связь с гидрофильной компонентой X не устойчива к гидролизу и расщепляется с образованием пятичленного циклического фосфата, при раскрытии цикла которого получается смесь 2- и 3-глицерофосфатов в отношении примерно 1:1. Атака HO^- по асимметрическому центру при C_2 , приводящая к глицеро-3-фосфату, может сопровождаться инверсией конфигурации:



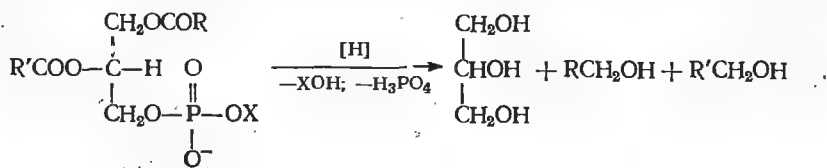
В кислой среде равновесие между 2- и 3-фосфатами смещено в сторону 3-фосфата.

Обработка фосфолипидов уксусным ангидридом приводит к расщеплению фосфоэфирной связи со стороны гидрофобной компоненты и последующему ацелированию образовавшегося диглицерида; при этом возможна ацильная миграция.

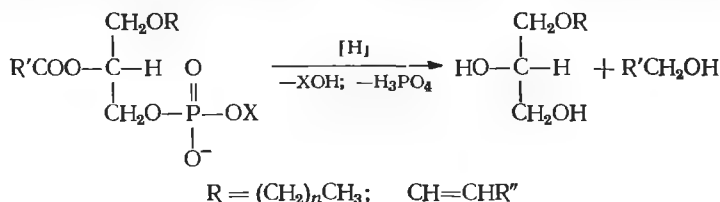
При действии диазометана расщепляется связь между фосфатидовой кислотой и полярной компонентой X и образуется диметилвый эфир фосфатидовой кислоты, сохраняющий первоначальную конфигурацию:



При действии литийалюминийгидрида на диацильные фосфолипиды расщепляются обе фосфоэфирные связи и сложноэфирные группы:



В случае фосфолипидов с простой эфирной связью происходит частичное расщепление молекулы с сохранением простой эфирной связи [116]:



МЕТОДЫ УСТАНОВЛЕНИЯ СТРУКТУРЫ ФОСФОЛИПИДОВ

Для изучения структуры фосфолипидов используют комплекс химических, ферментативных и физико-химических исследований.

Химические методы. Для анализа фосфолипидов часто используют методы частичного или полного гидролиза или алкоголиза [117]. Так, с целью определения жирнокислотного состава фосфолипидов проводят их метанолиз и полученные метиловые эфиры жирных кислот анализируют с помощью газо-жидкостной хроматографии. Щелочной гидролиз спиртовым раствором едкого натра дает водорастворимые фосфоэфиры, которые могут быть разделены и идентифицированы с помощью бумажной хроматографии.

В процессе щелочного и кислотного гидролиза фосфолипидов возможны вторичные изменения (например, миграция фосфатного остатка, рацемизация), в связи с чем следует проявлять определенную осторожность при интерпретации полученных данных [118].

Для определения положения жирных кислот в фосфолипидах используют метод ацетоллиза. Ацетаты, получаемые при действии уксусного ангидрида на фосфолипиды, исследуют методами газо-жидкостной или тонкослойной хроматографии на пластинках с силикагелем, импрегнированным AgNO_3 , где достигается их разделение по длине цепи, степени ненасыщенности, а также разделение изомеров с различным положением ацильных групп.

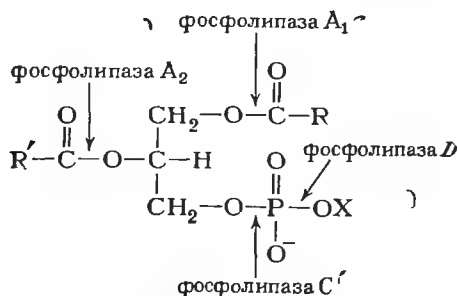
С помощью химических методов проводят определение присутствующих в фосфолипидах функциональных групп; например, используют ацилирование (OH - и NH_2 -группы), периодатное окисление (вицинальная гликольная группировка), реакцию с 2,4-динитрофторбензолом (NH_2 -группа) и т. д. Титрование кислотами и основаниями в неводной среде позволяет определить тип фосфолипида и его чистоту.

Способность к соле- и комплексообразованию часто позволяет различать типы фосфолипидов. Например, фосфатидилхолины легко образуют комплексы с CdCl_2 , а кислые фосфолипиды дают свинцовые соли.

Для качественного и количественного анализа фосфолипидов в настоящее время широко используют тонкослойную хроматографию на силикагеле [3]. При этом применение специфических реагентов, дающих характерное окрашивание для отдельных классов фосфолипидов, помогает осуществить их идентификацию. С помощью ТСХ может быть достигнут количественный анализ фосфолипидов при проведении денситометрических измерений пятен после проявления хроматограммы или путем анализа элюированных веществ на содержание фосфора.

Ферментативные методы. Для изучения структуры фосфолипидов широкое распространение получили ферментативные методы, с помощью которых осуществляется специфическое расщепление сложноэфирных связей фосфолипидов [119, 120].

Известно несколько фосфолипаз, вызывающих специфическое расщепление сложноэфирных групп в фосфолипидах:



В большей степени изучено строение фосфолипазы A_2 (фосфатид-ацилгидролазы, ЕС 3.1.1.4), обнаруженной в различных тканях животного организма (поджелудочная железа, печень, почки, мозг и т. д.) [121], змеином и пчелином яде, а также в некоторых бактериях (например, *E. Coli*) [122].

Фосфолипаза A_2 поджелудочной железы свиньи [123] представляет собой белок с молекулярной массой 14 000, присутствует в виде ферментативно неактивного зимогена, активация которого достигается расщеплением связи Arg—Ala, что приводит к образованию фосфолипазы A_2 и гептапептида. Фосфолипаза A_2 содержит 123 аминокислоты и 6 дисульфидных мостиков. Определена полная аминокислотная последовательность фермента и расположение дисульфидных связей.

Фосфолипаза A_2 гидролизует сложноэфирную связь в положении 2 во всех природных фосфоглицеридах, включая лецитины, кефалины, серинфосфатиды, фосфатидовые кислоты, фосфатидилглицерин и его аминокислотные производные, фосфатидилмиоинозит, а также плазмалогены, т. е. присутствие различных гидрофильных и гидрофобных компонент не влияет на ее специфичность, но существенно влияет на скорость гидролиза. Природа жирнокислотных остатков также не оказывает влияния на специфичность действия фосфолипазы A_2 , а сказывается лишь на скорости расщепления. Фосфолипаза A_2 проявляет высокую стереоспецифичность, расщепляя только производные 3-*sn*-глицерофосфата, что используется в структурном анализе природных и синтетических фосфолипидов. Фермент проявляет активность в присутствии ионов Ca^{2+} , рН оптимум 7,2.

В микросомальных фракциях различных тканей млекопитающих (мозг, поджелудочная железа, печень, селезенка и др.) обнаружена фосфолипаза A_1 (фосфатид-ацилгидролаза, ЕС 3.1.1.4), вызывающая расщепление сложноэфирных связей в положении 1 различных классов фосфоглицеридов. Известно, что фермент проявляет стереоспецифичность, аналогичную фосфолипазе A_2 , термически лабилен и имеет рН оптимум при 4,2.

Панкреатическая липаза (гидролаза эфиров глицерина, ЕС 3.1.1.3) гидролизует сложноэфирные связи в положении 1 фосфоглицеридов, однако не проявляет стереоспецифичности, свойственной фосфолипазам A_1 и A_2 . Известна также лизофосфолипаза (лизолецитин-ацилгидрола-

за, фосфолипаза В, ЕС 3.1.1.5), получаемая из животных источников и катализирующая гидролиз сложноэфирной связи в 2-лизофосфолипидах (т. е. липидах, содержащих ОН-группу при С₂).

Наряду с фосфолипазами, действующими на сложноэфирные связи с остатками жирных кислот, выделены липолитические ферменты, специфично расщепляющие фосфоэфирные связи. Из ряда бактериальных культур (например, *Clostridium welchii*, *Bacillus cereus* и др.) выделена фосфолипаза С (фосфатидилхолин-холинфосфогидролаза, ЕС 3.1.4.3), которая расщепляет фосфоэфирную связь с образованием 1,2-диацил-*sn*-глицерина и монофосфата гидрофильной компоненты X [14]. Фосфолипазы С из разных источников проявляют различную активность по отношению к различным классам фосфолипидов. Например, фосфолипаза С из *Clostridium welchii* гидролизует только фосфатидилхолины, а фермент из *Bacillus cereus* расщепляет большинство классов фосфолипидов.

В значительных количествах в хлоропластах ряда растений (морковь, капуста, шпинат, сахарная свекла) обнаружена фосфолипаза D, которая расщепляет фосфоэфирную связь между фосфатидовой кислотой и гидрофильной компонентой (X), что приводит к образованию фосфатидовой кислоты.

Замена жирнокислотного остатка на 1-алкенильноэфирную группу в плазмалогенах не изменяет специфичности липолитических ферментов, но существенно отражается на скорости гидролиза. Так, плазмалогены, как правило, расщепляются с меньшей скоростью, чем фосфолипиды ацильного типа [124]. Кроме указанных ферментов, выделены ферментные системы, расщепляющие алкенильноэфирную группу в плазмалогенах.

Используя совокупность указанных ферментативных превращений, можно провести структурный анализ фосфолипидов. Так, с помощью фосфолипаз A₁ и A₂ в сочетании с различными хроматографическими методами можно определить состав и положение жирных кислот в фосфолипидах. Именно ферментативные методы позволили выявить определенные закономерности в расположении жирных кислот в фосфолипидах: ненасыщенные жирнокислотные остатки обычно этерифицируют гидроксил при С₂.

Широкое применение фосфолипазы нашли в стереоспецифическом анализе фосфолипидов.

Фосфолипаза A₂ используется в синтетических целях [125] при получении определенных молекулярных видов фосфолипидов, а также при синтезе образцов с радиоактивной меткой, которые необходимы при проведении различных биохимических исследований.

Для изучения молекулярных видов фосфолипидов (т. е. фосфолипидов одного типа, отличающихся природой жирных кислот), используют их расщепление фосфолипазой С. Образующиеся при этом 1,2-диацил-*sn*-глицерины (или их производные) далее разделяют по степени ненасыщенности в слое силикагеля, импрегнированного нитратом серебра. Диглицериды затем обрабатывают панкреатической липазой для определения положения жирных кислот.

В настоящее время ферментативные методы являются наиболее перспективными и надежными в структурном анализе фосфолипидов.

Физико-химические методы. В химии фосфолипидов широко используется ИК-спектроскопия. Она дает информацию о классе фосфолипи-

дов, позволяет осуществить дифференциацию азотистых оснований, сделать выводы о ионной структуре фосфолипидов, определить наличие ряда функциональных групп (например, OH, NH₂, COOH, OCH=CH— и т. д.) в гидрофобной и гидрофильной частях молекулы [14].

Спектры ЯМР до недавнего времени применялись лишь для исследования отдельных фрагментов фосфолипидов, однако в настоящее время их используют для исследования нативных фосфолипидов и даже их комплексов, например с белками.

Для установления оптической чистоты фосфолипидов определяют их удельное вращение или используют метод дисперсии оптического вращения (ДОВ). В случае фосфолипидов, как правило, в области длин волн 230—600 нм получаются плавные кривые и метод ДОВ используется для определения оптической чистоты путем сопоставления оптических характеристик данного фосфолипида или соединения, полученного на его основе, с оптическими характеристиками известного соединения (химическая корреляция).

Общие методы исследования структуры фосфолипидов в зависимости от решаемых вопросов приведенных ниже.

I. Определение типа фосфолипидов.

1. ТСХ и идентификация со свидетелями.
2. ИК-спектроскопия.
3. Титрование кислотами и щелочами в неводной среде.
4. Действие специфических реагентов на функциональные группы: 2,4-динитрофторбензол (DNH₂); ацилирование (OH, NH₂); окисление IO₄⁻ (винильная гликольная группа).
5. Химический гидролиз и идентификация водорастворимых фрагментов.
6. Ферментативный гидролиз и идентификация фрагментов.

II. Определение общего жирнокислотного состава фосфолипидов.

Метаболиз (или гидролиз и этерификация высших жирных кислот), затем газо-жидкостная хроматография метиловых эфиров жирных кислот.

III. Определение жирнокислотного состава отдельных классов фосфолипидов.

ТСХ фосфолипидов, гидролиз каждого класса, ГЖХ метиловых эфиров жирных кислот.

IV. Определение распределения жирных кислот между положениями 1 и 2.

1. Гидролиз фосфолипазами, затем ГЖХ метиловых эфиров жирных кислот.
2. Ацетоллиз в 1,2-диацил-3-ацетил-*sn*-глицерин и исследование их с помощью ТСХ (силикагель/AgNO₃).

V. Стереоспецифический анализ.

1. Расщепление с помощью стереоспецифичных фосфолипаз.
2. Определение удельного вращения и применение метода ДОВ в сочетании с химической корреляцией.

ОБЩИЕ ПРИНЦИПЫ СИНТЕЗА ФОСФОЛИПИДОВ

Структура фосфолипидов как несимметричных диэфиров фосфорной кислоты и определяет принципиальные подходы к осуществлению их синтеза.

Основные проблемы синтеза фосфолипидов могут быть сформулированы следующим образом:

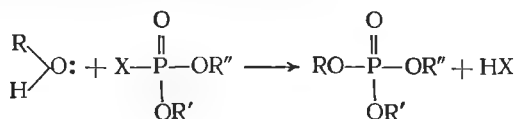
- 1) выбор метода фосфорилирования;
- 2) определение последовательности фосфорилирования неполярной (R) и полярной (R') групп;
- 3) выбор фосфорилирующего агента;
- 4) защита функциональных групп в защищенном фосфате и полярной компоненте молекулы.

Методы фосфорилирования

При синтезе фосфолипидов применяют общие методы фосфорилирования, используемые в синтезе других классов биологически активных фосфорных эфиров (нуклеотиды, нуклеотидные коферменты и т. д.) [64].

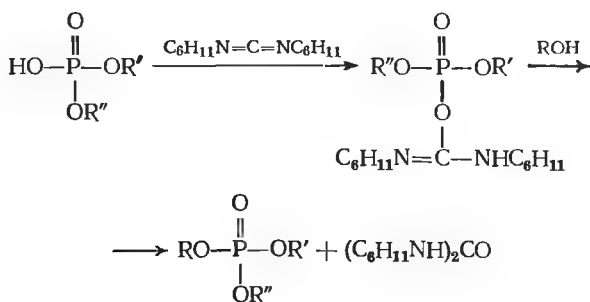
Эти методы можно классифицировать на две основные группы: 1) метод активированных фосфатов и 2) метод серебряных солей.

Метод активированных фосфатов. Для образования фосфорилирующего агента из устойчивого фосфорного соединения необходима активация одного из заместителей у атома фосфора. Активация достигается при введении электроотрицательного заместителя X. В результате этого возрастает оттягивание электронов от атома фосфора и облегчается отрыв заместителя в виде аниона X^- , вследствие чего становится возможной нуклеофильная атака атомом кислорода спирта (ROH) электрофильного атома фосфора [126]:

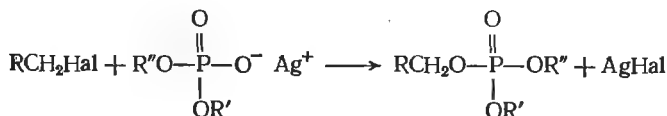


Активация, как правило, проводится путем введения остатков кислот. В качестве фосфорилирующих агентов используют хлорфосфаты, смешанные ангидриды фосфорной или фосфористой кислот и др. Фосфорилирование этими агентами осуществляется в присутствии органических и неорганических оснований.

Метод активированных фосфатов включает также и активацию замещенного фосфата в момент прохождения реакции. В качестве активирующего агента используют дициклогексилкарбодиимид (DCCD), ароматические сульфохлориды (мезитиленсульфохлорид, 2,4,6-триизопропилбензолсульфохлорид) и др. [127]:



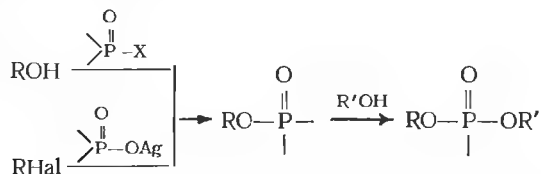
Метод серебряных солей. Фосфорилирование по этому методу достигается за счет нуклеофильной атаки аниона замещенного фосфата на α -углеродный атом алкилгалогенида:



Методы построения несимметричных диэфиров

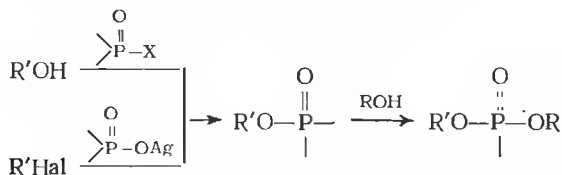
При получении фосфолипидов возможна различная последовательность фосфорилирования неполярной и полярной компонент молекулы, что определяется их доступностью и реакционной способностью [128].

Одна группа методов предполагает первоначальное фосфорилирование неполярной (гидрофобной) компоненты с образованием соответствующего моноалкилового эфира с последующим введением полярного остатка (R'):



По этому способу проводят фосфорилирование 1,2-диацил-*sn*-глицеринов или аналогичных производных с простой эфирной связью (а также их галогенгидринов) с образованием замещенных фосфатидовых кислот, от которых возможен переход к различным представителям фосфолипидов.

Согласно другому варианту, вначале фосфорилируют полярную компоненту ($R'OH$ или $R'Hal$) и далее полученный моноалкиловый эфир конденсируют с неполярной компонентой (ROH):



В соответствии с этим методом присоединение гидрофобной компоненты (например, 1,2-диацил-*sn*-глицерина), которая в большинстве случаев является более ценным исходным сырьем, осуществляется на заключительных этапах синтеза, и в ряде случаев этот метод имеет преимущества перед первым.

Фосфорилирующие агенты

Активированные фосфаты

Хлорокись фосфора нашла применение в синтезе различных классов фосфолипидов на ранних этапах развития химии липидов. Однако в процессе фосфорилирования возможно образование ряда побочных продуктов, главным образом симметричных фосфодиэфиров, что снижает выход целевого соединения. Фосфолипиды нужной структуры выделяют из сложной реакционной смеси, как правило, с помощью адсорбционной хроматографии на кремневой кислоте.

В настоящее время хлорокись фосфора вытеснена более эффективными фосфорилирующими агентами.

Фенилдихлорфосфат ($C_6H_5OPOCl_2$) применяют при получении различных классов фосфолипидов: фосфатидилхолинов и фосфатидилэтаноламинов и их аналогов, фосфолипидов с остатками оксиаминокислот

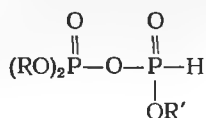
и т. д. [129]. К основным недостаткам фенилдихлорфосфата следует отнести возможность образования при фосфорилировании побочных продуктов (симметричных дизфиров) и неприменимость для синтеза ненасыщенных фосфолипидов (удаление фенильной группы каталитическим гидрированием).

К подобным же бифункциональным фосфорилирующим средствам следует отнести алкилдихлорфосфаты, $\text{ROP}(\text{O})\text{Cl}_2$ ($\text{R} = \text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Hal}$), которые нашли более широкое применение, чем фенилдихлорфосфат и пригодны для синтеза различных классов ненасыщенных фосфолипидов [130, 131].

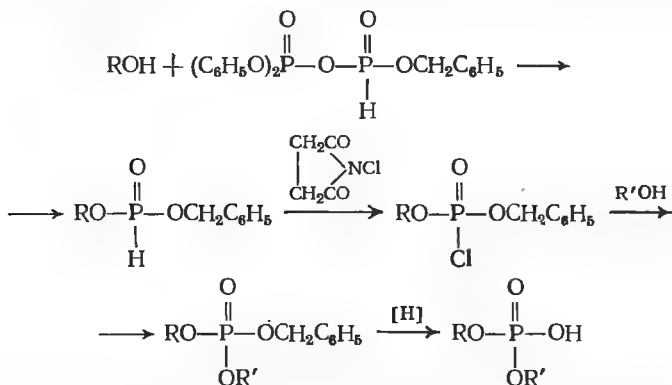
Хлорангидриды дизфиров фосфорной кислоты, $(\text{RO})_2\text{P}(\text{O})\text{Cl}$, являются монофункциональными фосфорилирующими агентами, что обеспечивает однозначность прохождения реакции. В химии липидов из этой группы фосфорилирующих средств наиболее распространен *дифенилхлорфосфат* [132]. Применение данного агента ограничено областью синтеза насыщенных соединений, вследствие необходимости удаления фенильных групп каталитическим гидрированием.

Дибензилхлорфосфат, используемый в синтезе некоторых фосфодиэфиров, в химии липидов применения не нашел, вследствие склонности его к взаимодействию с третичными аминами, в присутствии которых происходит фосфорилирование спиртов.

Смешанные ангидриды эфиров фосфорной и фосфористой кислот

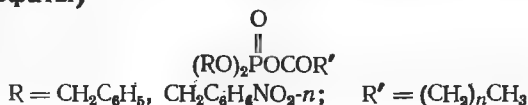


Из данной группы фосфорилирующих агентов в химии липидов используется смешанный ангидрид дифенилфосфорной и монобензилфосфористой кислот. В этом случае синтез осуществляют по следующей схеме:

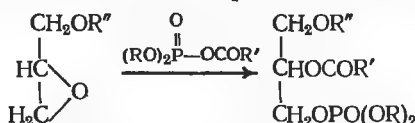


Метод реализован в синтезе кефалинов, фосфатидилсеринов, О-аминокислотных производных фосфатидилглицерина [133] и т. д.

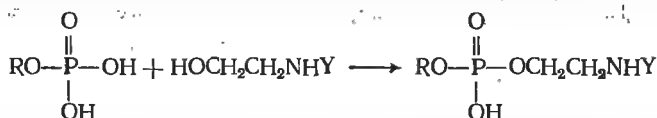
Смешанные ангидриды замещенной фосфорной и высших жирных кислот (ацилфосфаты)



использованы в химии липидов для одновременного введения остатка замещенной фосфорной кислоты и ацильного остатка при взаимодействии с алкильными и ацильными производными глицерола [134]:

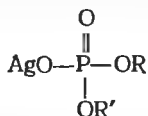


Активация с помощью дициклогексилкарбодиимида или других активирующих агентов. В химии липидов имеются многочисленные примеры создания фосфодиэфирной связи путем взаимодействия моноалкилфосфатов (в данном случае фосфатидовой кислоты) со спиртовыми компонентами в присутствии дициклогексилкарбодиимида (DCCD) [135] или 2,4,6-триизопропилбензолсульфохлорида (TPS) [136]:



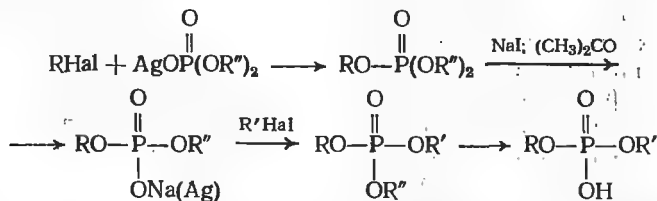
Метод дает хорошие результаты (особенно в случае применения триизопропилбензолсульфохлорида) и является достаточно перспективным в синтезе различных классов фосфолипидов.

Серебряные соли замещенных фосфатов



Фосфорилирование с использованием данных агентов в отличие от метода активированных фосфатов проходит однозначно, с высокими выходами, к тому же в условиях реакции исключается возможность ацильной миграции, с которой приходится считаться в методе активированных фосфатов. Кроме того, в данном методе в качестве исходных соединений используют галогенгидриды глицерина, содержащие остатки жирных кислот, спиртов или альдегидов. Эти соединения более доступны, чем 1,2-диацил-*sn*-глицерины или соответствующие им соединения с простой эфирной связью.

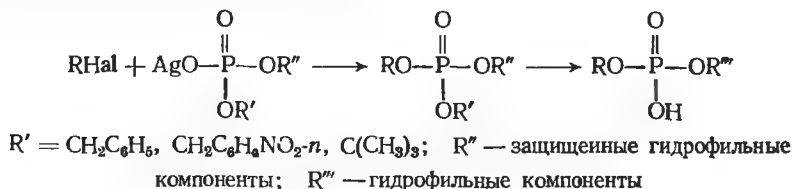
С целью последовательного введения остатка замещенной фосфорной кислоты и полярной компоненты (R') применяют следующие реакции:



В этом случае синтез проводится через стадию получения эфиров фосфатидовой кислоты $[\text{ROP}(=\text{O})(\text{OR}'')_2]$ и в качестве фосфорилирующего агента, как правило, используют серебряные соли дибензилфосфата ($\text{R}'' = \text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$) или *n*-нитробензилфосфата ($\text{R}'' = \text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{NO}_2$);

бензильные или *n*-нитробензильные группы удаляют затем анионным дебензилированием. Полученная серебряная соль далее конденсируется с галогенпроизводными азотистых оснований или других полярных остатков ($R'Hal$).

При одностадийном методе осуществляют фосфорилирование галогенгидринов замещенного глицерина ($RHal$) серебряными солями замещенных фосфорных кислот, содержащих защищенные азотистые основания, аминокислоты или другие полярные компоненты, с последующим удалением защитных групп:



Защита функциональных групп

Для проведения направленного фосфорилирования все функциональные группы азотистых оснований, оксиаминокислот, глицерина, миоинозита и других полярных компонент должны быть защищены, за исключением гидроксильных групп, подлежащих фосфорилированию.

Защитные группы должны проявлять устойчивость в условиях фосфорилирования и в ходе дальнейших превращений и в то же время легко удаляться на последней стадии без затрагивания других функциональных групп молекулы фосфолипида (сложноэфирной, амидной, фосфодиэфирной, алкенильноэфирной и т. д.).

Для защиты гидроксильных групп глицерина, углеводов, миоинозита, кроме указанных ранее защит (см. стр. 236), применяют *трет*-бутильную и циклогексилиденовую защиты, удаляемые мягким кислотным гидролизом, а также бензоильную и ацетильную, снимаемые гидразинолизом.

Защита NH_2 -группы. В синтезе кефалинов и фосфолипидов, содержащих аминокислоты, требуется предварительная защита NH_2 -группы (см. табл. 17).

Из перечисленных в табл. 17 защитных групп применение бензил-оксикарбонильной и бензильной ограничено синтезом насыщенных фосфолипидов, все остальные позволяют получать ненасыщенные соединения. Основными недостатками фталоильной защиты, ограничивающими ее использование, являются трудность ее полного удаления и частичное расщепление сложноэфирных связей в глицериновой части молекулы в условиях гидразинолиза.

Наиболее широко в последнее время применяются *трет*-бутилокси-карбонильная, β, β -трихлорэтоксикарбонильная и тритильная защиты.

Защита карбоксильной группы. Карбоксильные группы аминокислот блокируют бензильной (снимается каталитическим гидрированием) [133], *трет*-бутильной (снимается кислотным гидролизом) или фтал-имидометильной (снимается мягким гидразинолизом или действием цинка в уксусной кислоте) группировками.

Химия липидов располагает в настоящее время большим набором методов фосфорилирования, фосфорилирующих средств, способов создания диэфирной структуры, защитных групп.

Таблица 17. Защита аминогрупп при синтезе липидов

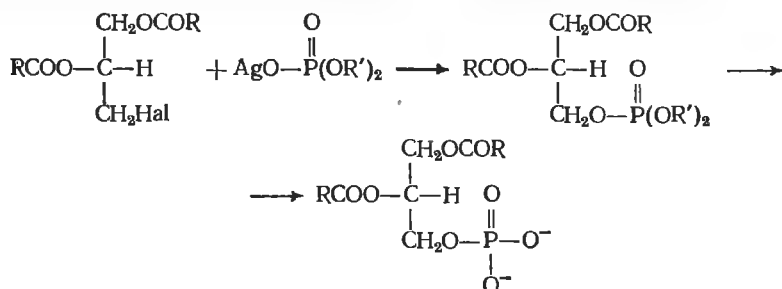
N-Защитная группа			Условия снытия	Литература
Формула	Название	Условное обозначение		
$\text{COOCH}_2\text{C}_6\text{H}_5$	Бензилоксикарбонильная	Cbz	Каталитическое гидрирование	[137]
$\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$	Бензильная	Bz	То же	—
$\text{C}_6\text{H}_4 \begin{cases} \text{CO—} \\ \text{CO—} \end{cases}$	Фталоильная	Pht	Гидразинолиз	[138]
$\text{COOC}(\text{CH}_3)_3$	<i>трет</i> -Бутилоксикарбонильная	BOC	Мягкий кислотный гидролиз	[139]
$\text{COOCH}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{OCH}_3$	Анизоилоксикарбонильная	—	Кислотный гидролиз	—
$\text{C}(\text{C}_6\text{H}_5)_3$	Тритильная	Tt	Кислотный гидролиз, каталитическое гидрирование, реакция перетритилирования	[140, 141]
$\text{COOCH}_2\text{CCl}_3$	β , β , β -Трихлорэтоксикарбонильная	—	Действие цинка в уксусной кислоте или спирте	[142]
$\text{CO}(\text{CH}_2)_2\text{CH}_2\text{Cl}$	4-Хлорбутироильная	—	Мягкий кислотный гидролиз или действие перхлората серебра	—

ОТДЕЛЬНЫЕ КЛАССЫ ФОСФОЛИПИДОВ

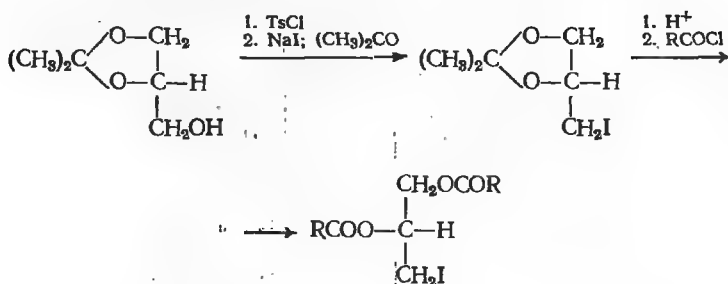
Фосфатидовые кислоты

Фосфатидовые кислоты присутствуют в незначительных количествах в животных и растительных тканях, но они являются ключевыми промежуточными соединениями в биосинтезе всех классов фосфолипидов и находят применение как исходные соединения в синтезе многих групп фосфолипидов.

Один из первых способов синтеза фосфатидовых кислот основан на фосфорилировании 1,2-диацил-*sn*-глицерина хлорокисью фосфора, однако выход при этом мал [139]. Лучшие результаты достигнуты по методу, основанному на конденсации 1,2-диацил-3-иод-3-дезоксид-*sn*-глицеринов с серебряными солями диэфиров фосфорной кислоты:



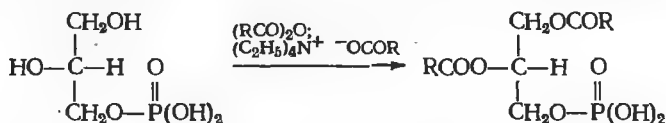
1,2-Диацил-3-иод-3-дезоксн-*sn*-глицерины получают, исходя из 1,2-изопропилиден-*sn*-глицерина [143]:



При использовании в качестве фосфорилирующих агентов серебряных солей дибензил- или ди-*n*-нитробензилфосфатов удаление бензильных или *n*-нитробензильных группировок на последней стадии синтеза осуществляют либо каталитическим гидрированием (при синтезе насыщенных соединений), либо с помощью ступенчатого дебензилирования, осуществляемого нагреванием с различными солями (NaI, LiI, BaI₂) в среде ацетона или других кетонов. Введение электроотрицательных заместителей (NO₂, Br, CN) в *para*-положение бензольного кольца значительно облегчает процесс анионного дебензилирования [144].

Для получения ненасыщенных фосфатидовых кислот обычно используют серебряную соль ди-*трет*-бутилфосфата, так как в этом случае снятие защитных групп осуществляют в одну стадию кислотным гидролизом.

Другие методы синтеза фосфатидовых кислот основаны на ацилировании рацемического или оптически активного глицерофосфата ангидридами жирных кислот в присутствии солей тетраэтиламмония [145]:



Однако по этому методу возможно получение лишь фосфатидовых кислот с одинаковыми ацильными группами.

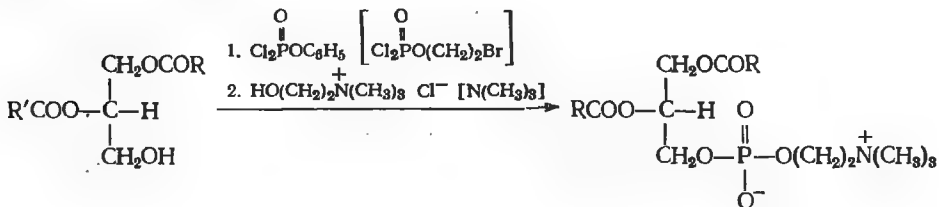
Смесь гомологичных фосфатидовых кислот может быть получена также ферментативным гидролизом природных лецитинов фосфолипидом *D* [128].

Фосфатидилхолины

Фосфатидилхолины (лецитины, 1,2-диацил-*sn*-глицерофосфорилхолины) являются наиболее распространенной структурной компонентой мембран и составляют около 50% от общего содержания липидов клеточных фракций.

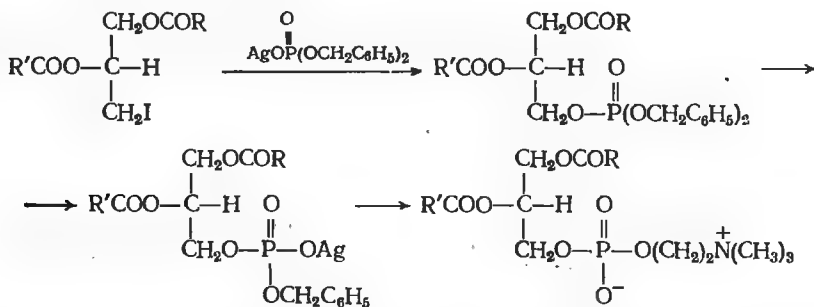
При синтезе фосфатидилхолинов по методу активированных фосфатов проводят фосфорилирование рацемических или оптически активных 1,2-диацил-*sn*-глицеринов фенилди-*хлор*фосфатом с последующим взаи-

модействием с галогенхолином или действием β -бромэтилдихлорфосфата с последующей обработкой триметиламином [130]:

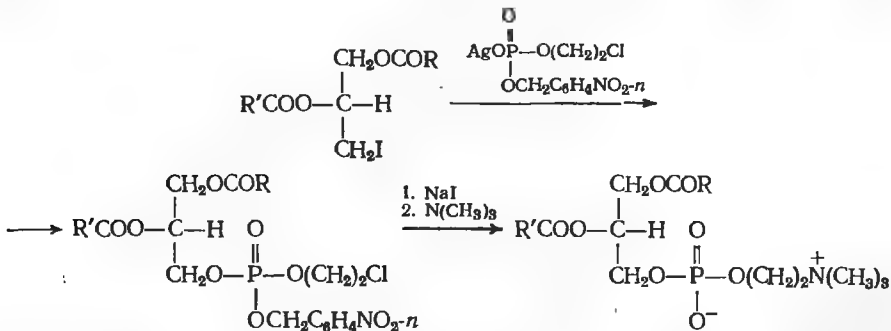


Аналогично получают алкильные аналоги фосфатидилхолина при использовании 1,2-диалкил- и 1-алкил-2-ацил-*sn*-глицеринов.

Синтез фосфатидилхолинов на основе фосфорилирующих агентов анионного типа осуществляется различными способами. Один вариант включает получение серебряной соли бензилфосфатидовой кислоты и введение остатка холина конденсацией с пикратом β -бромэтилтриметиламмония или с β -хлорэтилдиметиламином с последующей обработкой иодистым метилом [146]:

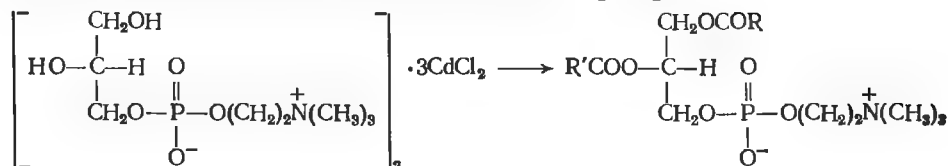


Согласно другому способу [147], проводят фосфорилирование серебряной солью *n*-нитробензил-2-хлорэтилфосфата и полученный эфир последовательно обрабатывают иодистым натрием и триметиламином:

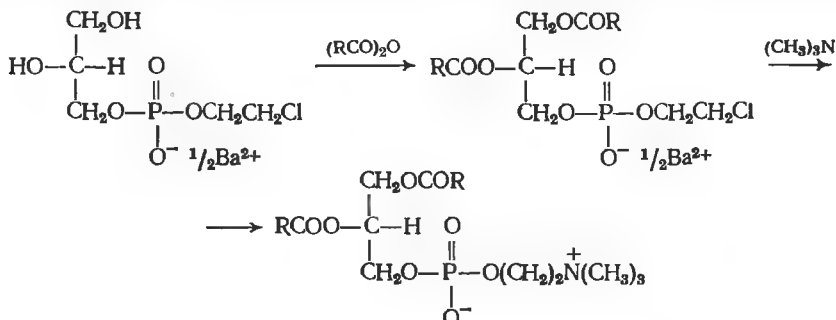


Для синтеза фосфатидилхолинов используют также ацилирование глицерофосфорилхолина, получаемого либо из 1,2-изопропилиден-*sn*-глицерина, либо щелочным или ферментативным деацилированием смеси природных лецитинов [148]. Ацилирование проводят действием на комплекс 3-*sn*-глицерофосфорилхолина с хлористым кадмием хлорангидри-

дов или ангидридов высших жирных кислот [149]:

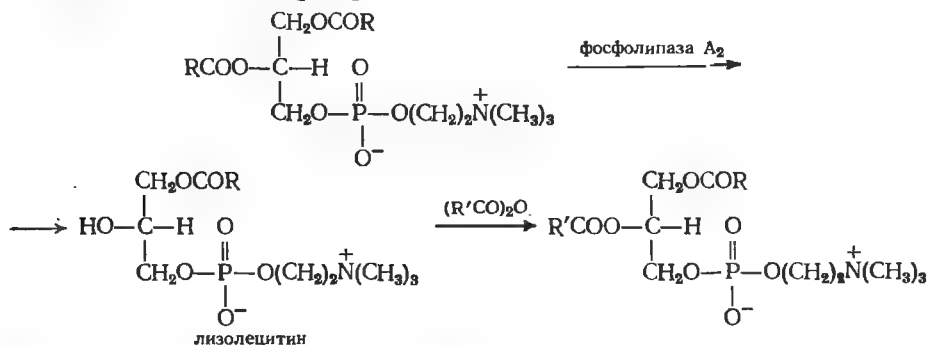


Лецитины можно синтезировать также ацилированием бариевой соли или кадмиевого комплекса *sn*-глицеро-3-(2-хлорэтил)-фосфата с последующей обработкой триметиламином:



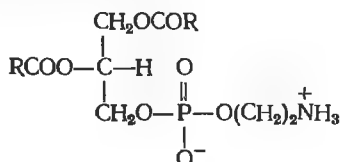
Частичные синтезы лецитинов проще и короче по сравнению с полными химическими синтезами и позволяют получать смешанные ненасыщенные лецитины.

Для перехода от лецитинов, содержащих остатки одинаковых кислот, к «смешанным» лецитинам используют деацилирование их с помощью фосфолипазы A_2 и последующее ацилирование образующегося при этом лизолецитина ангидридами жирных кислот в присутствии солей тетраэтиламмония [150]:



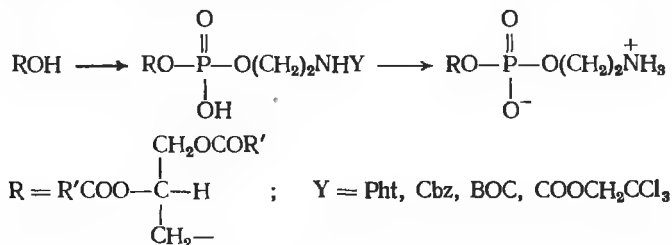
Фосфатидилэтаноламины и их производные

Фосфатидилэтаноламины (кефалины) представляют собой 1,2-диацил-*sn*-глицеро-3-фосфорилэтаноламины:

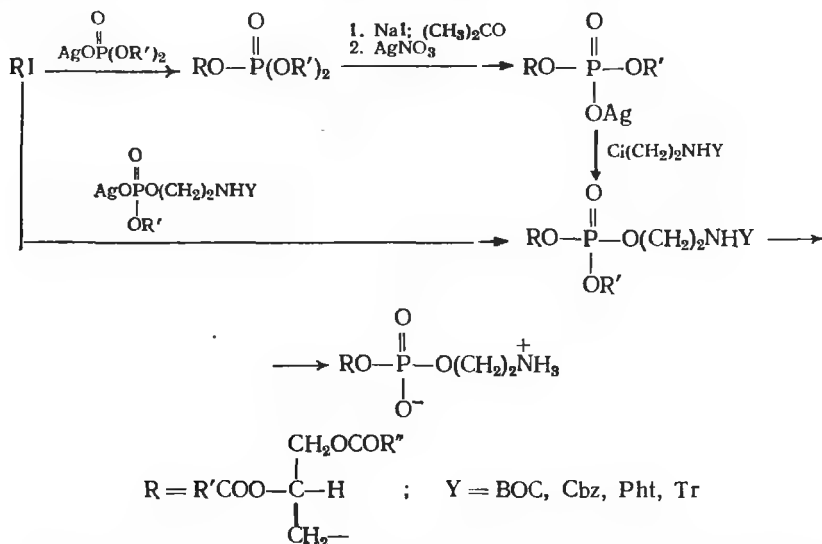


Из растительных и некоторых животных источников выделены N-ацильные производные фосфатидилэтаноламинов. Синтез отдельных молекулярных видов фосфатидилэтаноламинов представляет значительный интерес в связи с их важной биохимической ролью: они участвуют в процессе свертывания крови, зрительном акте и т. д.

Синтез фосфатидилэтаноламина по методу активированных фосфатов осуществляют фосфорилированием 1,2-диацил-*sn*-глицеринов или их алкильных аналогов алкилдихлорфосфатами, содержащими остаток защищенного этаноламина [130], или действием хлорокиси фосфора и N-защищенного этаноламина [139, 142]:



Различные типы фосфатидилэтаноламинов (ненасыщенные, смешанно-кислотные) синтезированы на основе 1,2-диацил-3-иод-3-дезокс-*sn*-глицеринов с использованием анионных фосфорилирующих агентов (табл. 18).



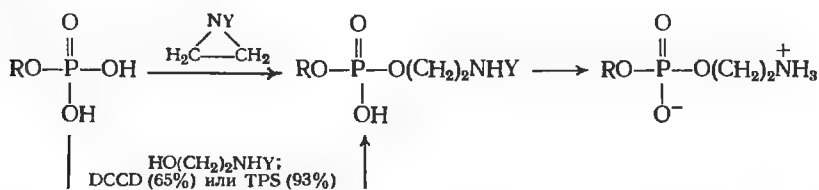
Фосфатидилэтаноламины получают конденсацией эфира серебряной соли фосфатидовой кислоты с N-защищенным β-галогенэтиламином [152] или взаимодействием 1,2-диацил-3-иод-3-дезокс-*sn*-глицеринов с серебряными солями диэфиров фосфорной кислоты. Оба варианта дают хорошие результаты и широко используются, однако в ряде случаев предпочтение отдают последнему в связи с меньшим числом стадий с исходным оптически активным сырьем.

В последнее время реализовано несколько методов синтеза фосфатидилэтаноламина, исходя из фосфатидовых кислот. Один из них основан

Таблица 18. Анионные фосфорилирующие агенты типа $\text{AgO}-\text{P}(\text{O})(\text{OR}')-\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{NHY}$

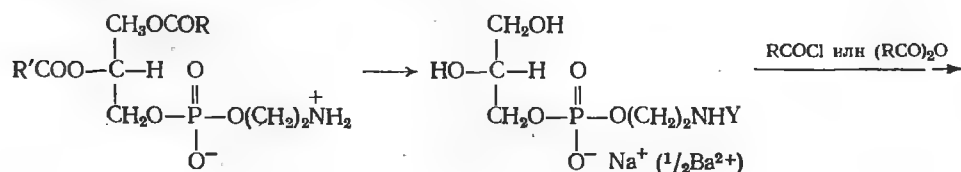
R'	Y	Условия снятия защитных групп (последовательно R' и Y)	Литература
C_6H_5	Cbz	Каталитическое гидрирование	[151]
$\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$	Phl	1. NaI 2. Гидразинолиз	[153]
$\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$	Tr	1. NaI 2. CH_3COOH	[140, 152]
$\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$	BOC	1. NaI 2. HCl	[128]
$\text{H}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{NO}_2-p$	BOC	1. NaI 2. HCl	—
$\text{C}(\text{CH}_3)_3$	BOC	HCl	[154]

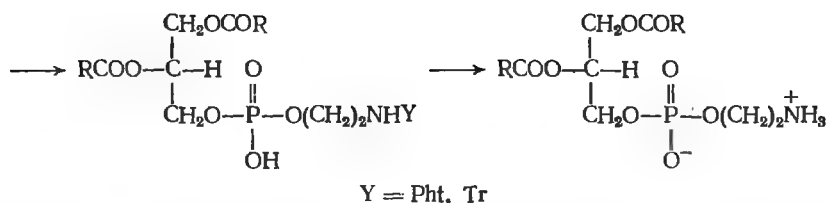
на взаимодействии N-третилэтиленимина с фосфатидовой кислотой с последующим удалением N-защитной группы [155]. Другая группа методов основана на реакции фосфатидовой кислоты с N-защищенным этаноламином в присутствии дициклогексилкарбодиимида [135] или 2,4,6-триизопропилбензолсульфохлаорида [136]:



Синтезы на основе фосфатидовых кислот перспективны, однако в настоящее время ограничены малой доступностью самих фосфатидовых кислот.

Для получения кефалинов применяют также частичные синтезы [140, 156], которые включают щелочное или ферментативное деацилирование смеси природных гомологичных кефалинов, введение N-защитной группы, ацилирование N-защищенного глицерофосфорилэтаноламина (в виде бариевой или натриевой соли) и последующее удаление N-защитной группы:

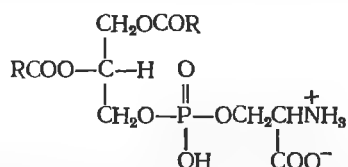




Важными промежуточными соединениями в биосинтезе лецитинов на основе фосфатидилэтаноламинов являются N-монометил- и N,N-диметилфосфатидилэтаноламины. Их получают на основе общих синтетических методов, разработанных в химии глицерофосфолипидов. Найденные в ряде растительных источников N-ацилфосфатидилэтаноламины получают ацилированием фосфатидилэтаноламина хлорангидридами или ангидридами кислот [157].

Фосфатидилсерины

Впервые фосфатидилсерины были выделены в 1948 г. из мозга быка. Позднее показано их присутствие в различных тканях животного организма (мозг, сердце, печень, кровь и т. д.) и в ряде растительных и бактериальных источников. Строение фосфатидилсеринов установлено на основании ряда химических превращений. Кислотный гидролиз фосфатидилсеринов показал наличие в их составе L-серина, глицерофосфата и жирных кислот в молярном отношении 1:1:2. Положительная реакция фосфатидилсеринов с нингидрином и азотистой кислотой подтвердила, что связь серина с фосфатидовой кислотой осуществляется через спиртовый гидроксил. Наконец, основываясь на идентичности продукта гидрирования фосфатидилсерина бычьего мозга и синтетического 1,2-дистеароил-*sn*-глицеро-3-фосфорил-L-серина, сделан вывод, что природные фосфатидилсерины являются 1,2-диацил-*sn*-глицеро-3-фосфорил-L-серинами:



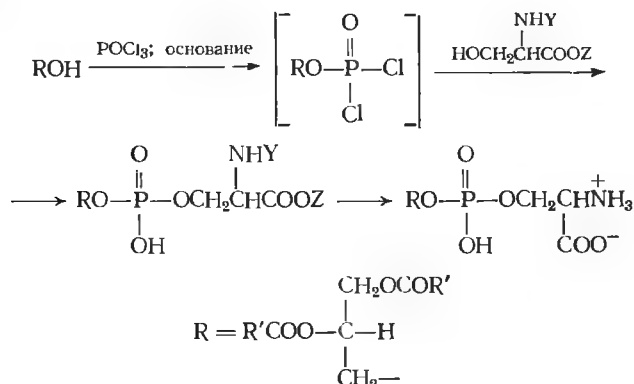
В отличие от лецитинов и кефалинов в сериновой части молекул фосфатидилсеринов присутствует дополнительный асимметрический центр, что обуславливает существование четырех стереоизомерных форм. В молекуле фосфатидилсеринов присутствуют две кислотные и одна основная функции, что в целом определяет их кислотные свойства.

В последние годы появился ряд сообщений о распространении в природе фосфолипидов, содержащих в качестве азотистого остатка различные пептиды, составными компонентами которых являются оксиаминокислоты (оксипролин, треонин или тирозин). Так, из мышц тунца выделен фосфатидилтреонин. Однако возможно, что подобные соединения являются лишь составной частью липопептидов.

Синтез фосфатидилсеринов более сложен, чем рассмотренных выше глицерофосфолипидов, в связи с необходимостью защиты двух функ-

циональных групп (NH_2 , COOH), наличием двух асимметрических центров и большей лабильностью ряда производных серина.

Для синтеза фосфатидилсерина по методу активированных фосфатов первоначально фосфорилируют рацемические или оптически активные 1,2-диацил-*sn*-глицерины (ROH) хлорокисью фосфора и далее без выделения промежуточного соединения проводят присоединение защищенного серина:

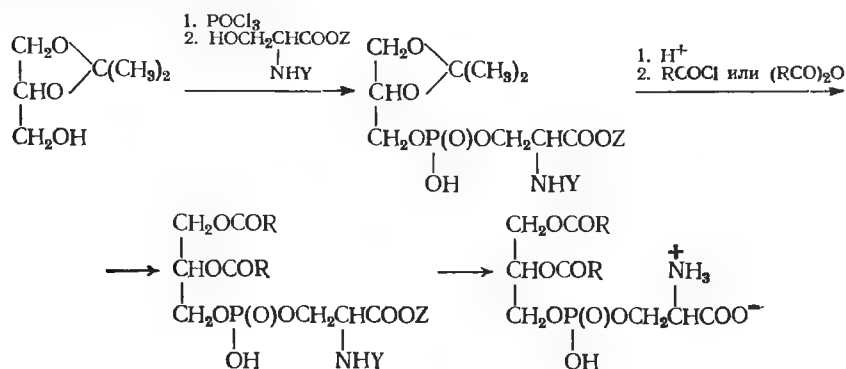


Для защиты COOH - и NH_2 -групп серина используют следующие группировки [158—160]:

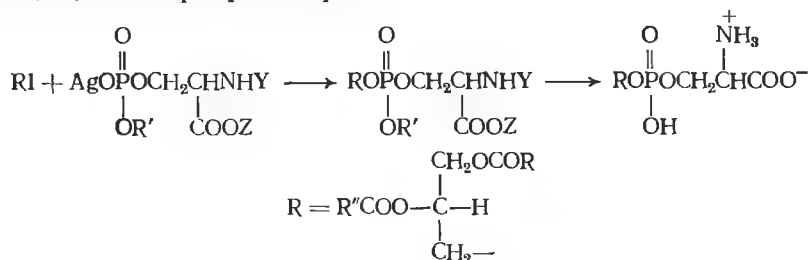
Y	Z
BOC	$\text{CH}_2\text{N}(\text{CO})_2\text{C}_6\text{H}_4$
$\text{CO}(\text{CH}_2)_2\text{CH}_2\text{Cl}$	$\text{CH}_2\text{N}(\text{CO})_2\text{C}_6\text{H}_4$
Phit	$\text{C}(\text{CH}_3)_3$
BOC	$\text{C}(\text{CH}_3)_3$

Эти группировки удаляют либо кислотным гидролизом (*трет*-бутоксикарбонильная, 4-хлорбутироильная, *трет*-бутильная), либо гидразином (фталимидометильная, фталимидная), что позволяет использовать их в синтезе ненасыщенных серинфосфатидов.

Вторая группа методов основана на фосфорилировании 1,2-изопропилиденглицерина хлорокисью фосфора, присоединении защищенного серина [161, 162], удалении изопропилиденовой защиты, ацилировании и удалении защитных групп:



Однако фосфорилирование проходит неоднозначно; лучшие результаты дают методы фосфорилирования с использованием серебряных солей защищенного фосфата серина:



При $\text{R}' = \text{C}_6\text{H}_5$ или $\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{NO}_2-n$, $\text{Y} = \text{Cbz}$, $\text{Z} = \text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$ после удаления защитных групп получают насыщенные фосфатидилсерины, а в случае $\text{R}' = \text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$, $\text{Y} = \text{BOC}$, $\text{Z} = \text{C}(\text{CH}_3)_3$ — ненасыщенные.

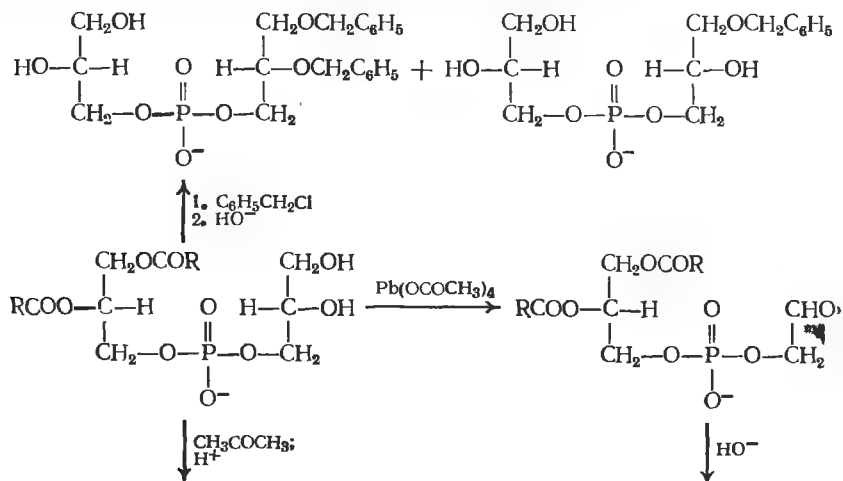
Следует отметить определенные трудности при синтезе серебряных солей защищенных фосфатов серина, что в первую очередь связано с фосфорилированием защищенного серина. Попытки конденсации галогенпроизводных защищенного серина с серебряной солью фосфатидовой кислоты оказались безуспешными, так как при этом происходит β -элиминирование галогеноводорода.

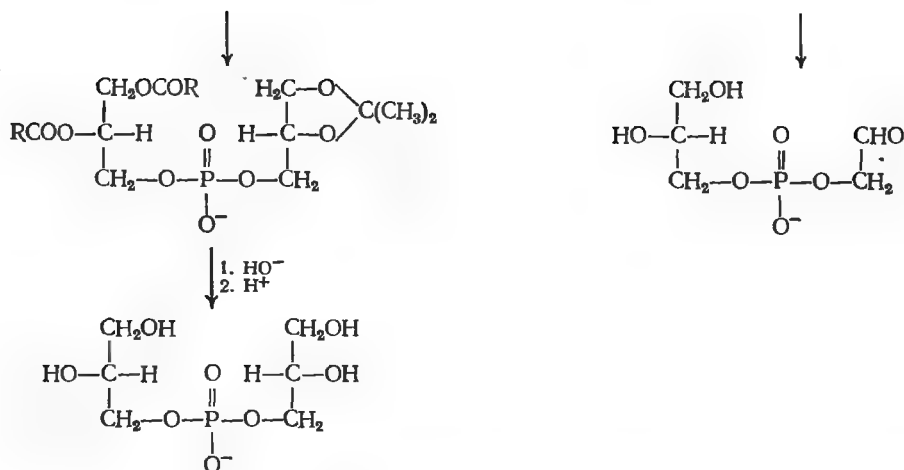
Полиглицерофосфатиды

Фосфатидилглицерин и его производные

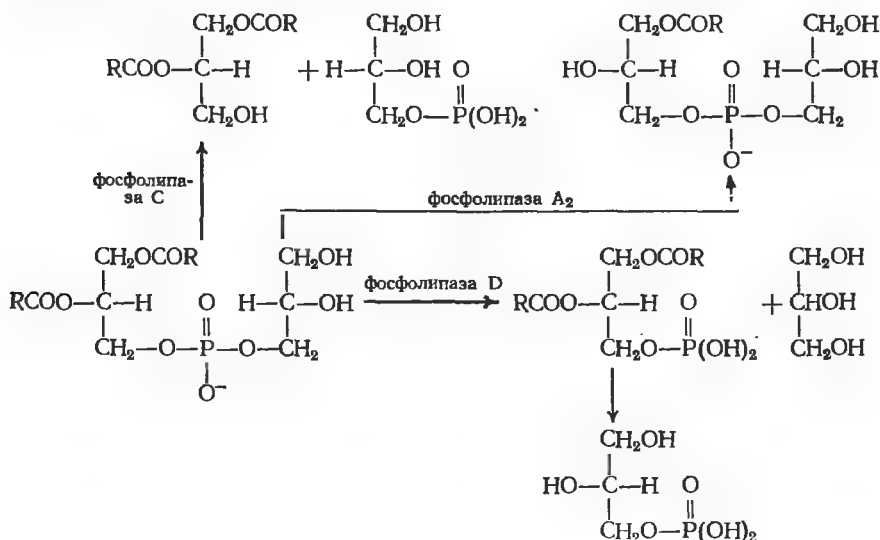
Фосфатидилглицерин является обязательным компонентом хлоропластов растений, некоторых бактерий, в небольших количествах он присутствует в животных тканях (печень, плазма крови и т. д.).

Общие представления о структуре фосфатидилглицерина были получены на основании ряда химических превращений, включающих получение изопропилиденового производного, бензиловых эфиров, а также окислительное расщепление тетраацетатом свинца:





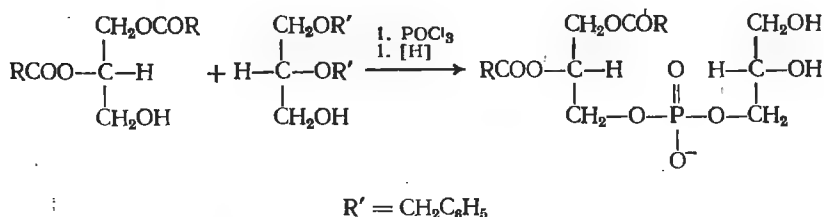
В связи с наличием двух асимметрических центров для фосфатидил-глицерина возможны четыре стереоизомерные формы. Выбор между ними сделан на основании данных ферментативного гидролиза фосфатидилглицерина. При действии фосфолипазы C фосфатидилглицерин дает *sn*-глицеро-1-фосфат и 1,2-диацил-*sn*-глицерин. При действии фосфолипазы D получены глицерин и 1,2-диацил-*sn*-глицерофосфорная кислота, при щелочном гидролизе которой образуется *sn*-глицеро-3-фосфат. Фосфолипаза A₂ отщепляет остаток жирной кислоты при C₂:



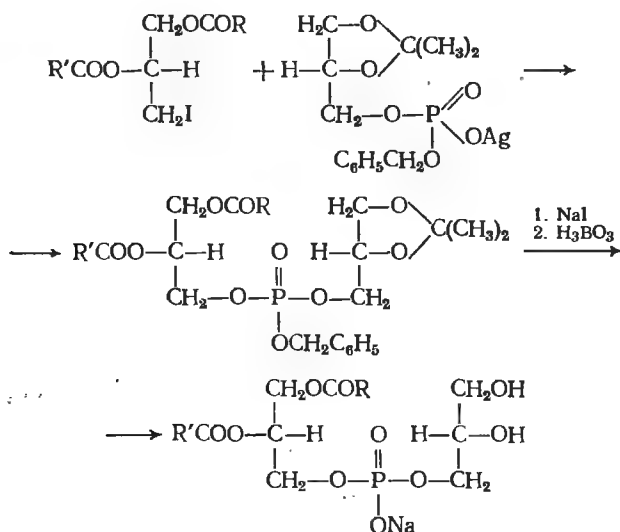
Это позволило прийти к заключению, что природный фосфатидил-глицерин имеет структуру 1'-(1,2-диацил-*sn*-глицеро-3-фосфорил)-*sn*-глицерина, т. е. два глицериновых остатка имеют противоположную конфигурацию. Окончательно структура фосфатидилглицерина доказана синтезом.

Соединение с природной конфигурацией получено по методу активированных фосфатов при конденсации 1,2-диацил-*sn*-глицерина с хлор-

окисью фосфора и 2,3-дибензил-*sn*-глицерином с последующим удалением защитных групп каталитическим гидрированием [163]:



Безусловно, более направленным является синтез природного фосфатидилглицерина, основанный на конденсации серебряной соли 2,3-изопропилиден-*sn*-глицеро-1-бензилфосфата с 1,2-диацил-3-иод-3-дезоксид-*sn*-глицерином и последующем дебензилировании и удалении изопропилиденовой защиты [164]:

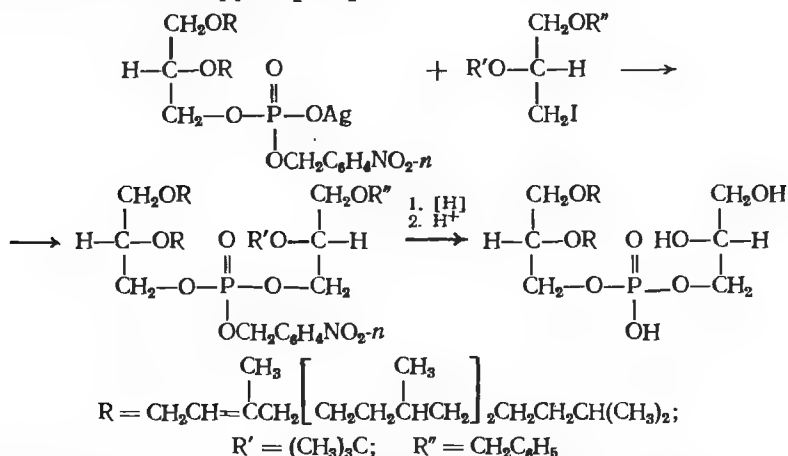


Существенным недостатком этого метода является необходимость применения малодоступного 2,3-изопропилиден-*sn*-глицерина, получаемого из *L*-арабинозы.

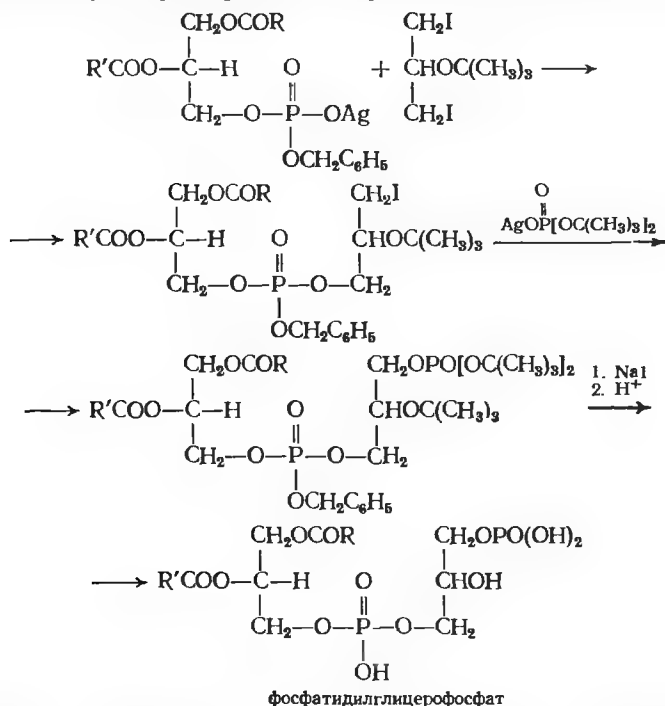
Кроме традиционных синтетических путей для получения фосфатидилглицерина была применена реакция перефосфатидилирования [165]. Она заключается в обработке природных глицерофосфолипидов, например лецитинов, фосфолипазой D в присутствии глицерина как акцептора образующейся фосфатидовой кислоты. Однако эта реакция проходит с низким выходом, и получается частично рацемический фосфатидилглицерин.

Из галофильных бактерий был выделен аналог фосфатидилглицерина, содержащий остатки фитола и имеющий стереохимическую конфигурацию 1-*sn*-фосфатидил-3'-*sn*-глицерина. Его получили конденсацией серебряной соли 2,3-дифитил-*sn*-глицеро-1-моно-*n*-нитробензилфосфата

с 1-бензил-2-*трет*-бутил-3-иод-3-дезоксн-*sn*-глицерином с последующим удалением защитных групп [166]:



Важным промежуточным соединением в биосинтезе фосфатидилглицерина и других полиглицерофосфатидов является фосфатидилглицерофосфат, получаемый конденсацией серебряной соли 1,2-диацил-*sn*-глицеромонобензилфосфата с 1,3-дииод-1,3-дидезокси-2-*трет*-бутилглицерином с последующим фосфорилированием продукта конденсации серебряной солью ди-*трет*-бутилфосфата и удалением защитных групп [144]:

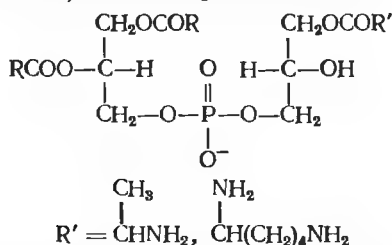


О-Аминокислотные эфиры фосфатидилглицерина. О-Аминокислотные эфиры фосфатидилглицерина (липоаминокислоты) найдены в основном у грамположительных бактерий. Количество липоаминокислот сильно

зависит от фазы развития микроорганизма и от состава и pH питательной среды.

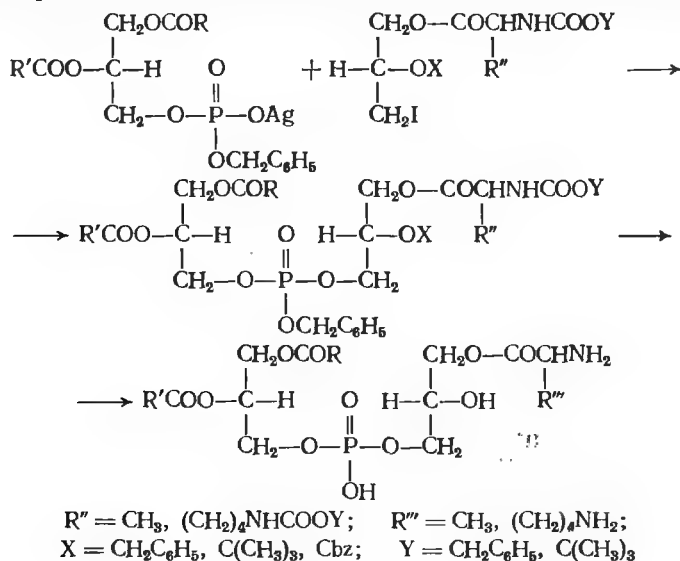
О-Аминокислотные эфиры фосфатидилглицерина относительно устойчивы в нейтральной и слабокислой среде, но чрезвычайно легко распадаются в щелочной среде. Так, при мягком щелочном гидролизе (pH 9) расщепляется сложноэфирная связь с аминокислотой. Подобная лабильность этих соединений и возможность миграции аминокислотного остатка не позволяли однозначно решить вопрос об их структуре.

Сравнение синтетических и природных соединений позволило прийти к заключению, что последние имеют структуру 1'-(3-*sn*-фосфатидил)-3'-О-(*L*-лизил или аланил)-*sn*-глицерина:

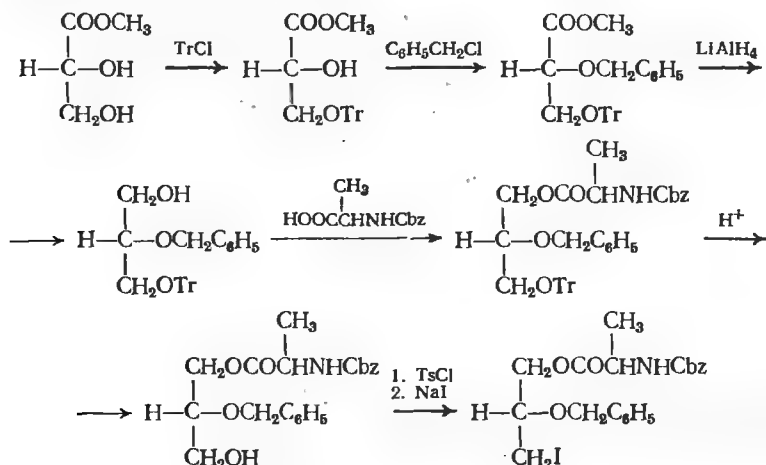


В настоящее время предложены различные методы синтеза рацемических [167] и энантиомерных аминокислотных эфиров фосфатидилглицерина [168, 169], содержащих аминокислоты в положении 3 или 2. Эти методы отличаются способом получения защищенной глицериновой компоненты, содержащей аминокислоту, видами защит и способами фосфорилирования.

Наиболее широкое развитие для получения аминокислотных эфиров фосфатидилглицерина природной конфигурации получил метод серебряных солей [168, 169]. В качестве фосфорилирующего агента используют серебряные соли бензилфосфатидовых кислот, а в роли алкилгалогенида — иодгидрины глицерина, защищенные в положении 2 и этерифицированные защищенной аминокислотой в положении 3:



Основные трудности при реализации данной схемы связаны с получением аминокислотной компоненты необходимой стереохимической конфигурации. Например, 3-(N-карбобензоксипанил)-2-бензил-3-иод-3-дезокси-*sn*-глицерин получен на основе метилового эфира 3-*sn*-глицериновой кислоты, приготовленного из 1,2-изопропилиден-*sn*-глицерина, по следующей схеме [168]:

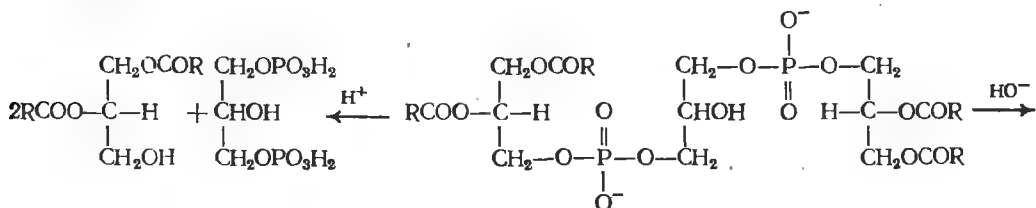


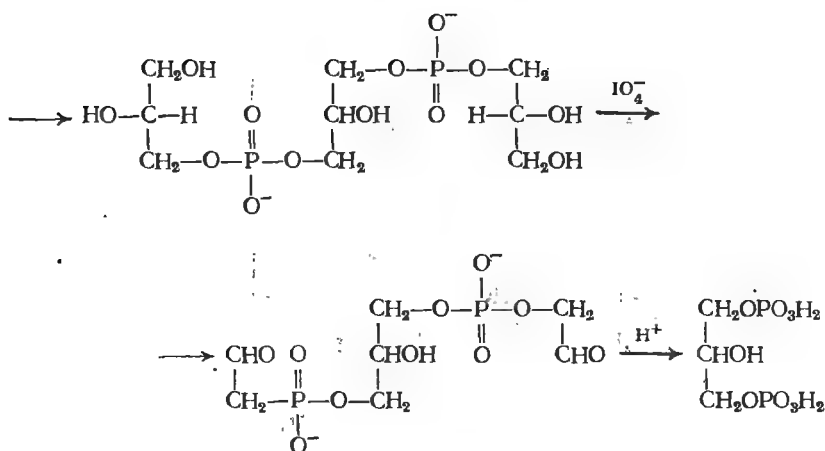
Синтетические исследования позволили однозначно решить вопрос о положении остатка аминокислоты в О-аминокислотных эфирах фосфатидилглицерина, а также сделать окончательный вывод о конфигурации этих соединений.

Кардиолипин и его производные

В 1941 г. Пангборн выделил из сердечной мышцы быка серологически активное соединение полиглицерофосфатного типа, которое он назвал кардиолипином. Позднее показано присутствие кардиолипина во многих тканях млекопитающих, бактериальных организмах, в зеленых листьях высших растений, дрожжах. Обычно содержание кардиолипина в тканях невелико, однако он является основным фосфолипидом митохондрий. Изучение состава кардиолипина показало присутствие в его молекуле остатков глицерина, фосфорной кислоты и жирных кислот в мольном отношении 3:2:4.

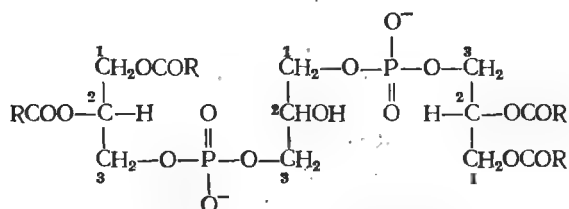
Основные химические превращения, позволившие получить представления о структуре кардиолипина, сводятся к его кислотному или щелочному гидролизу и периодатному окислению деацилированного соединения:





Указанные превращения подтверждают положение жирнокислотных остатков в молекуле кардиолипина и расположение фосфатидильных остатков у углеродных атомов 1 и 3 среднего глицеринового остатка, т. е. кардиолипин можно рассматривать как 1,3-дифосфатидилглицерин.

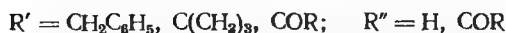
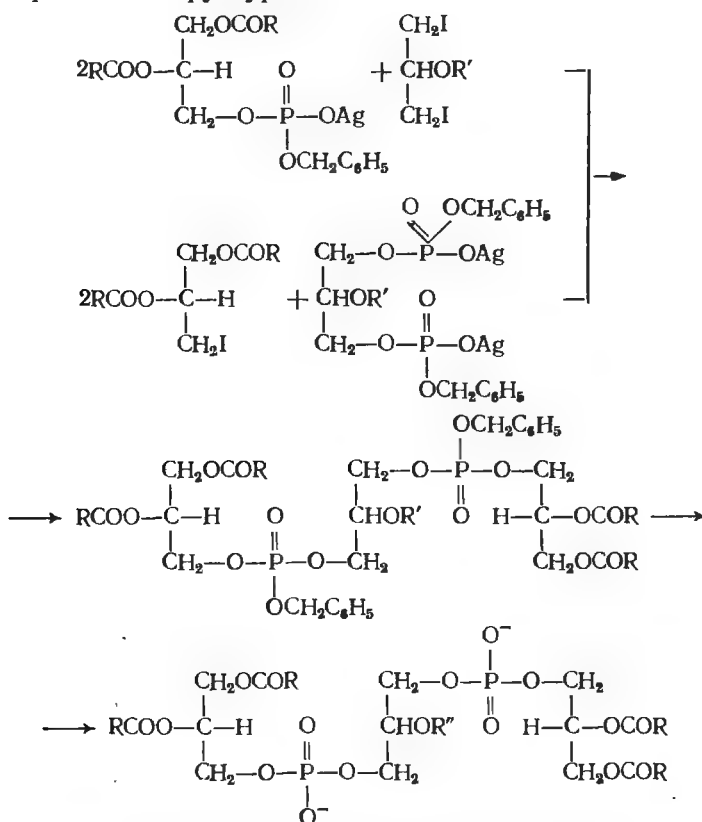
Природный кардиолипин является оптически деятельным соединением. Сравнение молекулярного вращения синтетического 1,3-бис(*sn*-глицеро-3-фосфорил)глицерина с деацилированным кардиолипином позволило природному кардиолипину приписать конфигурацию 1,3-бис-(1,2-диацил-*sn*-глицерофосфорил)глицерина:



Однако подобная структура окончательно доказана лишь для кардиолипина, выделенного из сердца крупного рогатого скота. Кардиолипин из печени имеет ряд особенностей, которые заставляют рассматривать в качестве возможных и иные структуры, в частности ацилированную форму кардиолипина. Не исключена вероятность существования и других аналогов кардиолипина.

С целью подтверждения структуры кардиолипина и изучения его серологической активности был осуществлен синтез дифосфатидилглицерина. При использовании в качестве фосфорилирующего агента POCl_3 [170] получается сложная смесь продуктов, в которой содержание нужного соединения не превышает 10–20%, поэтому метод не получил широкого распространения. Лучшие результаты достигнуты при фосфорилировании серебряными солями диэфиров фосфорной кислоты

[171, 172]. При этом возможны различные варианты построения полиглицерофосфатидной структуры:



Выходы на стадии конденсации с серебряными солями обычно составляют 65—75%.

Для защиты средней гидроксильной группы дифосфатидилглицеринового скелета применяют *трет*-бутильные [171] или бензильные группировки [172]. Последующее удаление бензильных групп осуществляют каталитическим гидрированием, а в случае *трет*-бутильной защиты — анионным дебензилированием удаляют бензильную группу при замещенном фосфате, а затем действием хлористого водорода удаляют *трет*-бутильную группировку. Для синтеза ацильных производных кардиолипина успешно реализованы оба варианта, представленные на схеме 4.

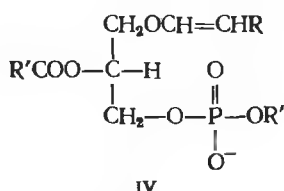
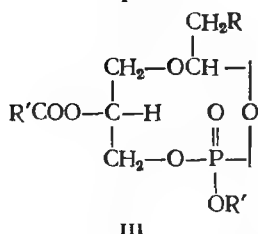
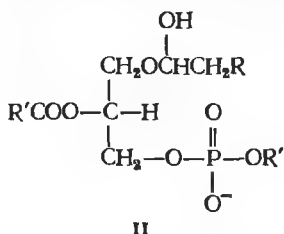
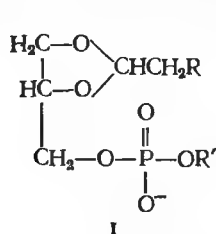
Фосфорсодержащие плазмалогены

Фосфорсодержащие плазмалогены присутствуют во всех органах и тканях животного организма [92—94, 173]. Так, в человеческом организме они составляют примерно 22% от суммарного содержания фосфолипидов. Особенно велико содержание плазмалогенов в головном и спинном мозге, сердечной мышце и т. д., 25—30% сухой массы мозга составляют фосфолипиды, которые на 50—90% в различных его отделах представлены плазмалогенами.

Глицерофосфолипиды, содержащие группу $-\text{OCH}=\text{CH}-$ (альдегидогенные), найдены также в различных видах простейших, морских и сухопутных беспозвоночных и позвоночных, насекомых, рыбах, микроорганизмах, растениях [92].

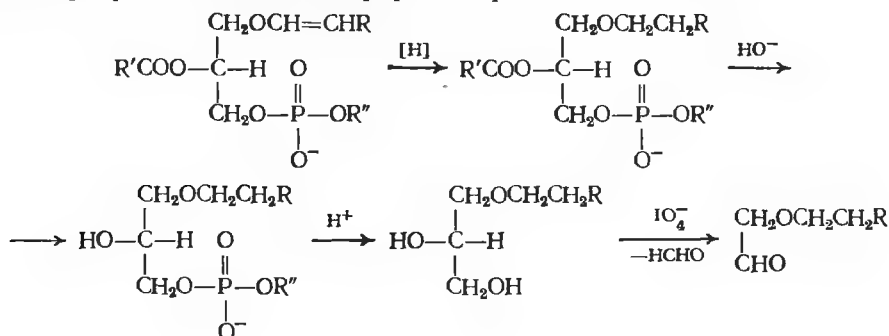
Основными формами существования альдегидогенных глицерофосфолипидов являются фосфатидальэтаноламин и фосфатидальхолин. В меньших количествах в альдегидогенной форме присутствуют кислые фосфолипиды — фосфатидальсерин, фосфатидальинозит, кардиолипин и фосфатидалева кислота (см. стр. 265).

В результате многочисленных исследований для плазмалогенов были предложены четыре возможные структуры: циклический ацеталь (I), полуацеталь (II), ангидрид (III) и алкен-1-иловый эфир (IV):



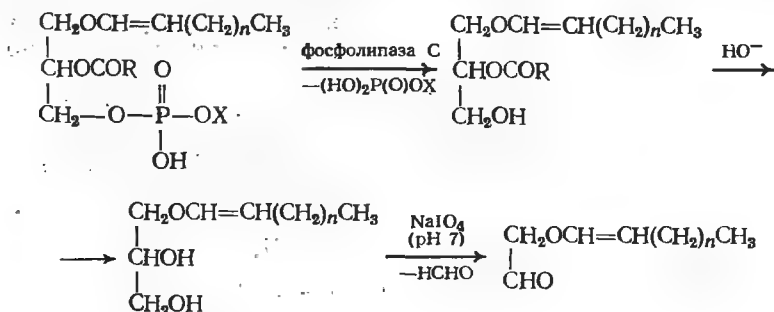
Структуры I—III не получили экспериментального подтверждения. В пользу структуры алкенильноэфирного типа (IV) ряд доказательств был получен при изучении присоединения иода, брома, водорода, озонирования, а также на основании данных гидролиза окисью трития. Вопрос о взаимном расположении алкенильноэфирного и жирнокислотного остатков был решен на основании ряда химических и ферментативных превращений.

Гидрирование плазмалогена дает соответствующий алкилацилфосфолипид, при последовательном кислотном и щелочном гидролизе которого образуется алкиловый эфир глицерина:



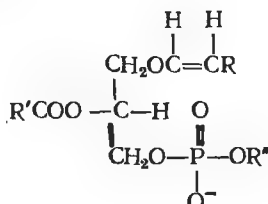
Строение этого эфира изучалось с помощью ИК-спектроскопии и периодатного окисления.

Проводя деградацию в более мягких условиях (отщепление замещенного фосфата фосфолипазой С, деацилирование щелочью при 37 °С), можно сохранить винильноэфирную связь:



Данные превращения несомненно свидетельствуют о расположении алкенильноэфирного остатка у первичной гидроксильной группы. Сравнение ИК- [174], ЯМР- [175] и масс-спектров нативных плазмалогенов и продуктов их деградации с аналогичными характеристиками синтетических алкен-1-иловых эфиров позволило приписать двойной связи плазмалогенов *цис*-конфигурацию.

Оптическая конфигурация плазмалогенов как *цис*-1-О-(алкен-1-ил)-2-ацил-*sn*-глицеро-3-фосфатов

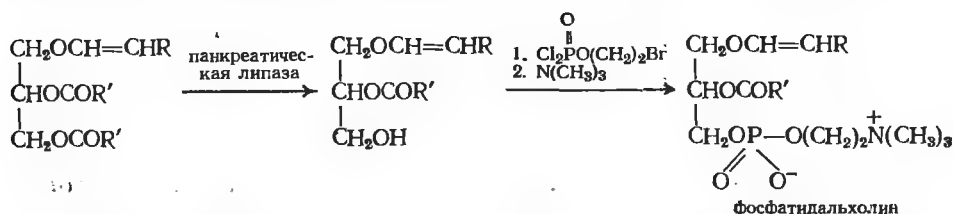


была определена на основании идентичности кривых ДОВ алкилглицеро-диацетатов, полученных из плазмалогенов сердца свиньи, и диацетатов природных батилового и химилового спиртов [176].

Синтез плазмалогенов представляет собой более сложную задачу по сравнению с синтезом фосфолипидов ацильного и алкильного типов. Одновременное присутствие активной кислототабильной *цис*-винильноэфирной связи и щелочелабильной сложноэфирной связи значительно сокращает число методов, пригодных для химического синтеза этих соединений. Дополнительные трудности возникают при осуществлении синтеза соединений природной стереохимической конфигурации.

Впервые синтез одного из представителей фосфорсодержащих плазмалогенов — фосфатидальхолина — был осуществлен фосфорилированием рацемического 1-О-(алкен-1-ил)-2-ацилглицерина дихлорангидридом β-бромэтилфосфорной кислоты с последующей обработкой триметиламином [177]. 1-О-(Алкен-1-ил)-2-ацилглицерин был получен лишь с помощью ферментативного гидролиза нейтрального плазмалогена панкреатической липазой, осуществляющей избирательное отщепление

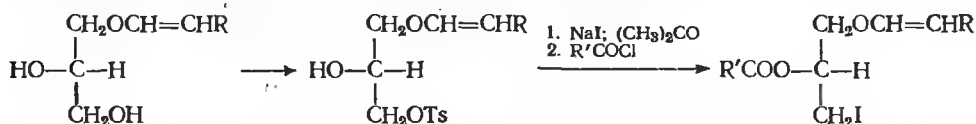
первичной сложноэфирной группы с сохранением алкенильноэфирного остатка:



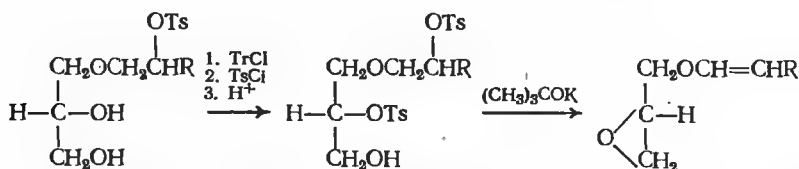
Существенными недостатками этого метода являются малая доступность исходного диглицирида и низкий выход фосфатидальхолина; кроме того, этим методом было синтезировано лишь рацемическое соединение в виде неприродного *транс*-изомера.

Лучшие результаты в синтезе фосфорсодержащих плазмалогенов были достигнуты при использовании фосфорилирующих агентов анионного типа. Выбор подобного метода фосфорилирования однозначно определяет необходимость применения в качестве исходного сырья *цис*-1-О-(алкен-1-ил)-2-ацил-3-галоген-3-дезоксис-*sn*-глицеринов. Для синтеза последних предложены различные методы.

Один из них [178] основан на последовательном введении заместителей в молекулу *цис*-1-О-(алкен-1-ил)-*sn*-глицерина; сначала осуществляли избирательное тозилирование первичной гидроксильной группы при низкой температуре, а затем замену тозилосигруппы на иод и ацилирование вторичной гидроксильной группы:



В другом методе используют *цис*-1-О-(алкен-1-ил)-*sn*-глицидолы [179, 180], синтез которых осуществляют тозилированием 3-О-(2-тозил-оксисилкил)-*sn*-глицерина по вторичной гидроксильной группе (с предварительным введением тритильной группы) с последующей обработкой дитозильного производного *трет*-бутилатом калия. При этом происходило элиминирование 2 моль *n*-толуолсульфокислоты с одновременным построением алкенильноэфирной группы и замыканием оксиранового цикла с обращением конфигурации при C₂ [179, 180]:

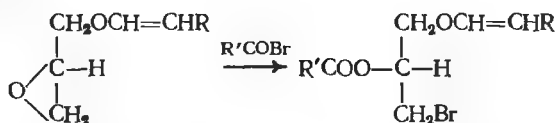


В результате этой реакции образуется смесь *цис*- и *транс*-изомеров, которую разделяют хроматографией на силикагеле, импрегнированном AgNO₃.

Отделенный *транс*-изомер подвергают каталитической изомеризации, приводящей к равновесной смеси изомеров.

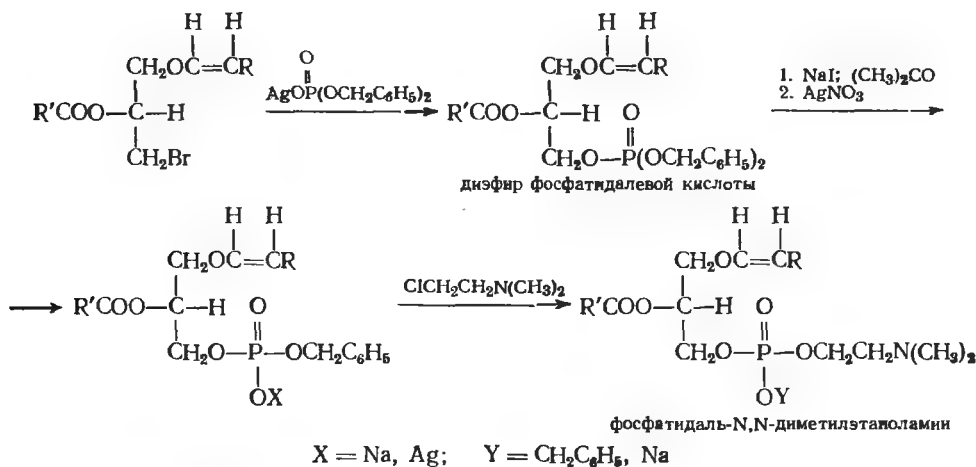
Показано [181], что раскрытие окисного кольца в *цис*-1-О-(алкен-1-ил)-*sn*-глицидоле бромангидридами высших жирных кислот протекает

направленно с образованием *цис*-1-О-(алкен-1-ил)-2-ацил-3-бром-3-дезокси-*sn*-глицеринов



которые могут быть использованы в синтезе плазмалогенов природной стереохимической конфигурации.

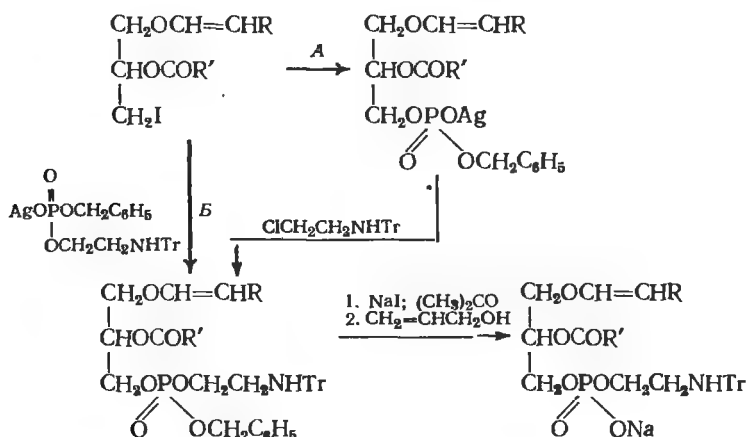
Для перехода от 1-О-(алкен-1-ил)-2-ацил-3-галоген-3-дезокси-*sn*-глицеринов к фосфорсодержащим плазмалогенам различной структуры осуществлялась их конденсация с серебряными солями замещенных фосфорных кислот. В частности, синтез фосфатидаль-N,N-диметилаэаноламина [182], являющегося необходимой биогенетической ступенью при переходе от фосфатидальэаноламина к фосфатидальхолину, проводится через стадию получения диэфира фосфатидалево́й кислоты с последующим введением азотистого основания описанными в химии фосфолипидов методами:



В ходе указанных превращений не наблюдается *цис,транс*-изомеризации или рацемизации.

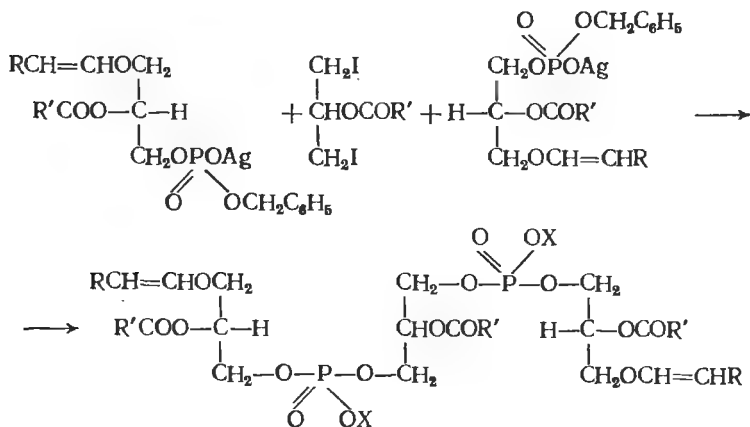
При осуществлении синтеза различных классов фосфорсодержащих плазмалогенов кроме уже решенных общих химических и стереохимических проблем возникает вопрос о выборе специфичных О- и N-защитных групп, так как в большинстве случаев защитные группы, используемые в химии фосфолипидов ацильного и алкильного типа, здесь не применимы. Так, основная трудность в синтезе кефалин-плазмалогенов связана с необходимостью введения N-защитных групп, которые должны удаляться в условиях, исключающих кислотный или щелочной гидролиз, а также каталитическое гидрирование. Этим требованиям не удовлетворяет ни одна из N-защитных групп, применяемых в синтезе кефалинов со сложноэфирной связью. Эта проблема была решена при использовании N-триметилной группы, для снятия которой осуществляют реакцию перетримилирования путем нагревания с различными спиртами (аллиловый, этиленгликоль, фенол и др.).

Кефалин-плазмалогены получают либо последовательным введением защищенных фосфатной и этиламинной группировок (путь А) в молекулу 1-О-(алкен-1-ил)-2-ацил-3-галоген-3-дезоксиглицерина, либо введением их в одну стадию конденсацией его с серебряной солью защищенного фосфозаноламина (путь В) [141]:

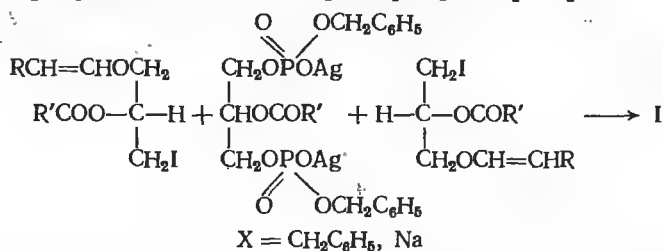


Оба варианта дают хорошие результаты, и все стадии проходят с достаточно высокими выходами.

Широкие возможности метода серебряных солей продемонстрированы также при осуществлении синтеза одного из наиболее сложных представителей плазмалогенов — дифосфатидальацилглицерина (альдегидогенного ацилкардиолипина) [183, 184]. Синтез этого соединения (I) осуществлен двумя способами: конденсацией серебряной соли фосфатидалево́й кислоты с диалогенипроизводным, соответствующим средней части полиглицерофосфатидного скелета [183]



и конденсацией *цис*-1-О- (алкен-1-ил)-2-ацил-3-галоген-3-дезоксиглицерина с дисеребряной солью глицеродифосфата [184]:



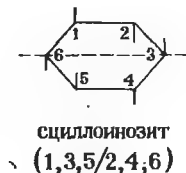
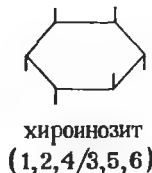
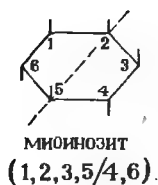
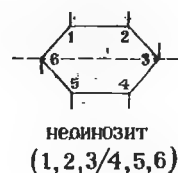
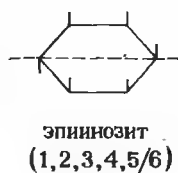
Оба метода дают примерно одинаковые результаты, хотя предпочтение все же следует отдать последнему, так как при общем равном числе стадий последний вариант позволяет сократить число операций при работе с лабильными альдегидогенными соединениями.

Разработанные в настоящее время методы открывают путь к синтезу различных классов сложных плазмалогенов с разнообразными гидрофобными и гидрофильными компонентами.

Фосфоинозитиды

Стереохимия и номенклатура миоинозита и его производных

Инозит — гексаоксициклогексан — существует в виде 8 изомеров (положение OH-групп обозначено черточками):



Во всех стереоизомерах, за исключением хиринозита, имеется хотя бы одна плоскость симметрии.

В составе фосфоинозитидов обнаружен лишь миоинозит, который имеет плоскость симметрии, проходящую через положения 2,5, вследствие чего он является оптически неактивным, т. е. представляет собой *мезо*-форму. Однако асимметрично замещенные производные миоинозита, содержащие заместители в положениях 1, 3, 4 или 6, обладают оптической активностью.

Для рацемических и оптически активных производных миоинозита предложен ряд номенклатур, отличающихся способами нумерации кольца и критериями, определяющими принадлежность к тому или иному стереохимическому ряду.

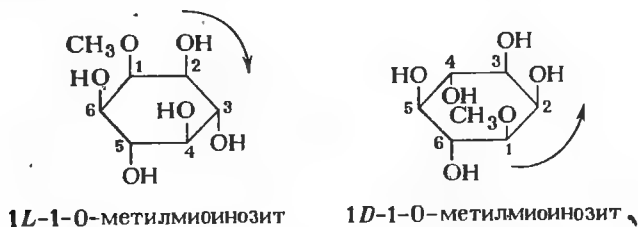
В 1967 г. комиссией IUPAC—IUB в целях единообразия и упорядочения номенклатуры циклитолов предложена система обозначений, которая и будет использована в данной книге [185]. Согласно данной номенклатуре, для обозначения углеродных атомов кольца миоинозита применена нумерация в соответствии со стерическими отношениями и природой заместителей в кольце. Для мезо-соединений низший номер присписывается такому положению, при котором соединение предпочтительно относится к *L*-ряду (нежели к *D*) при определении абсолютной конфигурации в соответствии с данной номенклатурой.

Абсолютная конфигурация производных миоинозита определяется по низшему хиральному атому углерода. С этой целью формулу изображают соответственно вертикальной проекции Фишера—Толленса так, чтобы C_1 располагался наверху. Тогда конфигурация обозначается как *D*, если OH-группа при C_1 располагалась справа, и как *L*, если она размещена слева:



Перед символами *D* и *L* ставится цифра 1, указывающая, что принадлежность к стереохимическому ряду определена по низшему (т. е. C_1) хиральному центру. Для рацемических соединений употребляется символ *DL*, а отсутствие префиксов *D*, *L* и *DL* указывает на мезо-форму.

Для определения абсолютной конфигурации пользуются упрощенным вариантом указанного правила, который сводится к тому, что если при написании формулы (с нумерацией по часовой стрелке) заместитель при хиральном атоме углерода (C_1) располагается ниже плоскости кольца, то соединение принадлежит к *D*-ряду, а если выше — к *L*-ряду. В случае нумерации против часовой стрелки обозначения противоположны, например:



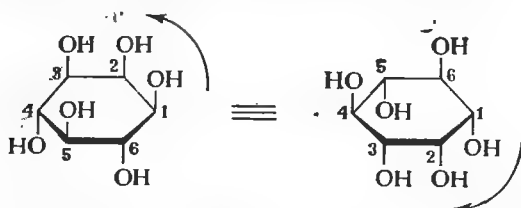
Однако существует и ряд других номенклатур циклитолов, которые до сих пор встречаются в литературе.

Согласно системе *D/L*, принадлежность к стереохимическому ряду определяется, как и в случае углеводов, конфигурацией хирального центра, имеющего наибольший порядковый номер (т. е. C_6), по отношению к *D*- или *L*-глицериновому альдегиду. Системы

R/S и *D/L* имеют те же недостатки, которые присущи аналогичным системам, относящимся к производным глицерина.

Для обозначения конфигурации асимметрично замещенных миоинозитов применяют также стереоспецифическую нумерацию, предложенную Хиршманном (см. стр. 224).

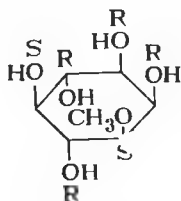
Предложена также стереоспецифическая номенклатура [186], согласно которой отсчет всегда начинается с атома углерода, имеющего *S*-конфигурацию. Это означает, что если при обычном изображении молекулы миоинозита три соседние *цис*-ОН-группы расположены над плоскостью кольца, то отсчет ведется против часовой стрелки, а при их изображении под плоскостью кольца — по часовой стрелке:



Такая нумерация сохраняется независимо от того, есть или нет заместитель в кольце миоинозита, и однозначно определяет стереохимию асимметрично замещенных миоинозитов.

Для отличия от нумерации оптически неактивных производных миоинозита, где *C*-атому, гидроксил при котором защищен другой группой, дается наименьший возможный номер, при стереоспецифической номенклатуре перед словом миоинозит предложено писать символ «*sn*». В молекуле асимметрично замещенных производных миоинозита положения 1 и 3, 4 и 6 являются энантиомерными, что и находит свое отражение в стереоспецифической номенклатуре. Например, 1- и 3-фосфаты *sn*-миоинозита являются энантиомерами.

В соответствии со всеми приведенными выше номенклатурами (—)-борнезит, например, может быть назван следующим образом:



Номенклатура

IUPAC	1 <i>D</i> -1-О-Метилмиоинозит
<i>D/L</i>	1 <i>L</i> -1-О-Метилмиоинозит
<i>R/S</i>	1 <i>S</i> -1-О-Метилмиоинозит
« <i>sn</i> »	1-О-Метил- <i>sn</i> -миоинозит
Стереоспецифическая нумерация	3-О-Метилмиоинозит

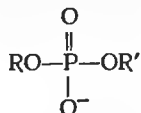
Строение фосфоинозитидов

Инозитфосфатиды (фосфоинозитиды) впервые выделены из туберкулезных бацилл, а позднее показано их присутствие в растительных и животных тканях, где они выполняют важную биологическую роль.

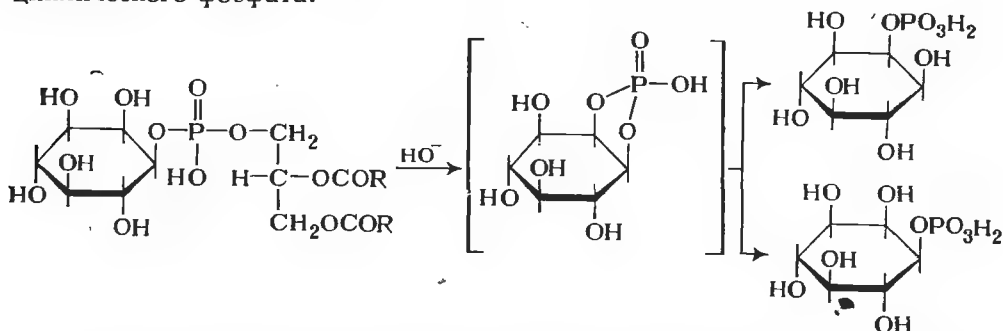
Природные фосфоинозитиды можно классифицировать на три основные группы: монофосфоинозитиды, полифосфоинозитиды и комплексные или сложные фосфоинозитиды.

Монофосфоинозитиды. Изучение монофосфоинозитида из сердечной мышцы и зародышей пшеницы и продуктов его гидролиза позволило установить присутствие в нем жирных кислот, глицерина, миоинозита и фосфорной кислоты в мольных соотношениях 2 : 1 : 1 : 1.

Анализ и идентификация продуктов гидролиза монофосфоинозитидов показали, что эти соединения являются несимметричными диэфирами фосфорной кислоты общей формулы



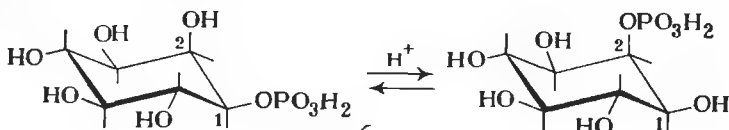
где R — остаток миоинозита, R' — остаток 1,2-диацил-*sn*-глицерина, т. е. они имеют структуру фосфатидилмиоинозита. В течение ряда лет большинство исследователей считало, что фосфатный остаток расположен у аксиальной ОН-группы при С₂ миоинозита, так как при гидролизе монофосфоинозитида был выделен 2-фосфат миоинозита. Однако оказалось, что гидролиз природных фосфоинозитидов из различных источников приводит к смеси 2- и 1-фосфатов миоинозита, образование которых возможно в результате фосфатной миграции в условиях гидролиза, протекающего через стадию образования промежуточного циклического фосфата:



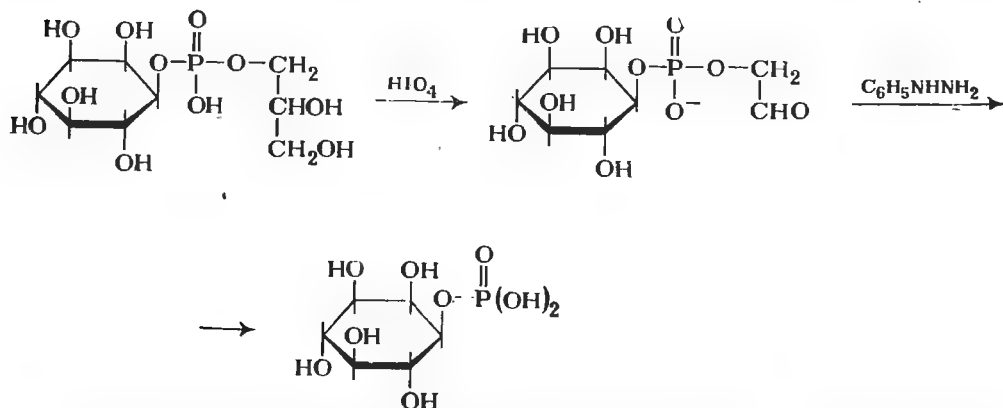
Получение оптически деятельного миоинозитфосфата при щелочном гидролизе монофосфоинозитида можно было представить лишь как результат образования асимметричного циклического 1,2-фосфата из 1-фосфата и последующего расщепления его действием щелочи в миоинозит-1-фосфат. Оптически активный миоинозитфосфат не мог образоваться из соединения, имеющего фосфатную группу в положении 2 (т. е. имеющего плоскость симметрии).

Миоинозит-2-фосфат при обработке дициклогексилкарбодиимидом давал циклический фосфат, при мягком кислотном или щелочном гидролизе которого были получены два миоинозитфосфата. Один из них был идентичен исходному миоинозит-2-фосфату, а другой — миоинозит-1-фосфату, однако в отличие от него не обладал оптической активностью.

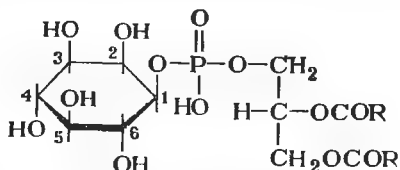
Изучение катализируемой кислотами изомеризации миоинозитмонофосфатов показало, что подобная миграция фосфатной группировки в случае 4- и 5-фосфатов, имеющих соседние *транс*-гидроксильные группы, затруднена, в то время как 1- и 2-фосфаты легко превращаются друг в друг:



На основании данных кислотного и щелочного гидролиза можно сделать вывод, что в природных фосфоинозитах фосфатный остаток присоединен к С₁ молекулы миоинозита. Аналогичные выводы получены в результате превращения миоинозит-1-фосфоглицерина в миоинозит-1-фосфат в условиях, почти исключающих фосфатную миграцию. С этой целью миоинозит-1-фосфоглицерин подвергали периодатному окислению с последующим расщеплением фосфодиэфирной связи фенилгидразином:



Все приведенные выше данные позволили прийти к однозначному заключению, что миоинозит содержит фосфатидильный остаток в положении 1 (экваториальный), т. е. природные фосфоинозитиды имеют структуру 1D-1-O-(1,2-диацил-*sn*-глицерофосфорил)-миоинозита:



Полифосфоинозитиды. Полифосфоинозитиды (ди- и трифосфоинозитиды) обнаружены в головном мозге человека и животных, дифосфоинозитид обнаружен также в фосфолипидной фракции сои.

Для выяснения положения фосфатных остатков в кольце миоинозита было проведено исчерпывающее изучение миоинозитполифосфатов, полученных щелочным гидролизом полифосфоинозитидов мозга быка. Для этого использован ряд химических и ферментативных методов [187]: периодатное окисление, миграция фосфатных группировок в контролируемых условиях, частичное дефосфорилирование с помощью оснований, частичное ферментативное дефосфорилирование.

Периодатное окисление миоинозитполифосфата, имеющего две соседние незамещенные гидроксильные группы, с последующим восстановлением полученного диальдегида и дефосфорилированием полифосфата дает полиол, строение которого зависит от числа фосфатных групп и их положения в миоинозитном кольце. Так, миоинозитмонофосфат полностью окисляется периодатом натрия с образованием неорганического фосфата, муравьиной кислоты и двуокиси углерода. Миоинозит-1,4-дифосфат реагирует аналогичным образом, 1,2-дифосфат окис-

ляется в трейт, а миоинозит-1,3-дифосфат дает пентит. Миоинозит-1,3,5- и -2,4,6-трифосфаты устойчивы к окислению, а остальные миоинозит-трифосфаты дают в этих условиях пентит или гексит.

Возможность миграции фосфатных групп в кислой среде у миоинозитмонофосфатов и миоинозитполифосфатов определяется *цис*- или *транс*-ориентацией соседних гидроксильных групп. Так, перемещение фосфатного остатка к соседней *цис*-гидроксильной группе идет в значительно более мягких условиях, нежели к *транс*-гидроксильной. Миоинозитполифосфаты, содержащие одну из фосфатных группировок в положении 1 или 2, быстро изомеризуются при нагревании с кислотами, эфиры с иным положением фосфатных остатков в этих условиях значительно более устойчивы, а миграция фосфатного остатка к соседней *транс*-гидроксильной группе затруднена. Периодатное окисление продуктов кислотной изомеризации миоинозитполифосфатов дает возможность дифференцировать миоинозиттрифосфаты, содержащие фосфатные группы в положении 1 или 2 и отличающиеся местом прикрепления остальных фосфатных остатков.

Частичное дефосфорилирование миоинозитполифосфатов при помощи мягкого щелочного гидролиза не сопровождается миграцией фосфатных групп и приводит к образованию миоинозитмонофосфатов, которые содержат оставшийся фосфатный остаток в том же положении, что и исходный миоинозитполифосфат.

Дефосфорилирование миоинозитполифосфатов щелочной фосфатазой протекает с различной скоростью в зависимости от взаимного расположения фосфатных группировок и свободных гидроксильных групп. Так, фосфатные группы, смежные с незамещенными гидроксильными, гидролизуются значительно быстрее, чем смежные фосфатные остатки. При действии щелочной фосфатазы на несимметричный миоинозиттрифосфат выделен миоинозит-*о*-дифосфат. Из продуктов гидролиза миоинозит-*о*-дифосфата не удается выделить миоинозитмонофосфат из-за сравнимой скорости дефосфорилирования обеих фосфатных групп. При действии щелочной фосфатазы на *п*-дифосфат миоинозита в качестве промежуточного соединения выделяют миоинозитмонофосфат.

Перечисленные методы анализа позволили установить строение миоинозитди- и -трифосфатов, получаемых щелочным гидролизом полифосфоинозитидов мозга быка. Выделенные изомерные миоинозитдифосфаты имели одинаковый состав, но различные оптические свойства. Один из них окислялся периодатом натрия с образованием неорганического фосфата, муравьиной кислоты и двуокиси углерода, что свидетельствовало о *пара*-ориентации фосфатных групп. При частичном щелочном и ферментативном гидролизе этого соединения образуются 1*D*-миоинозит-1-фосфат и 1*D*-миоинозит-4-фосфат. Легкость кислотной изомеризации исследуемого дифосфата в 1*D*-миоинозит-2,4-дифосфат характеризует присутствие фосфатной группы в положении 1 или 2. На основании данных реакций и сравнения его с синтетическим 1*D*-миоинозит-1,4-дифосфатом этому соединению приписана структура 1*D*-миоинозит-1,4-дифосфата (см. схему I на стр. 306).

При периодатном окислении, последующем восстановлении и дефосфорилировании второго миоинозитдифосфата был выделен *D*-трейт, что подтверждало 4,5- или 1,6-расположение фосфатных групп. При обработке его аммиаком получены миоинозит-4- и 5-фосфаты, а при действии щелочной фосфатазы — миоинозит (см. схему II на стр. 306).

Схема I

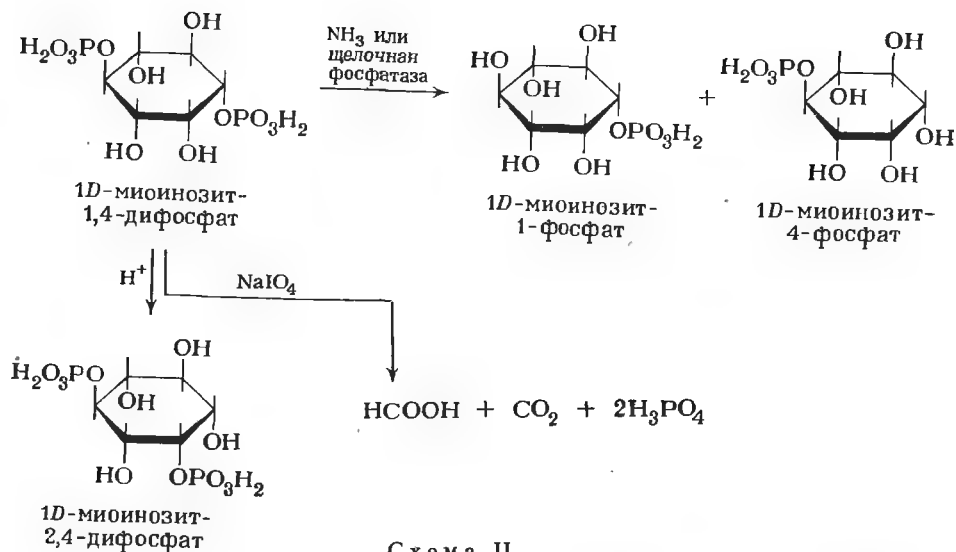
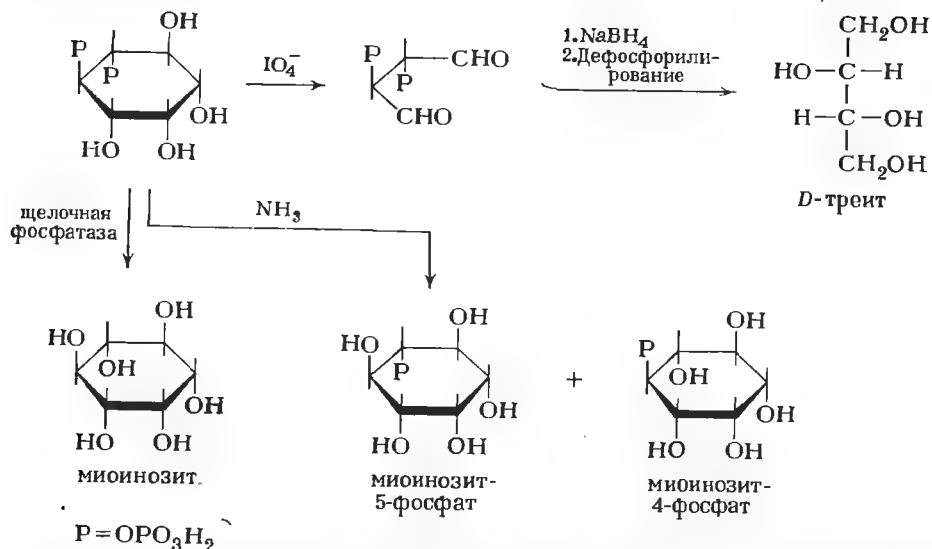


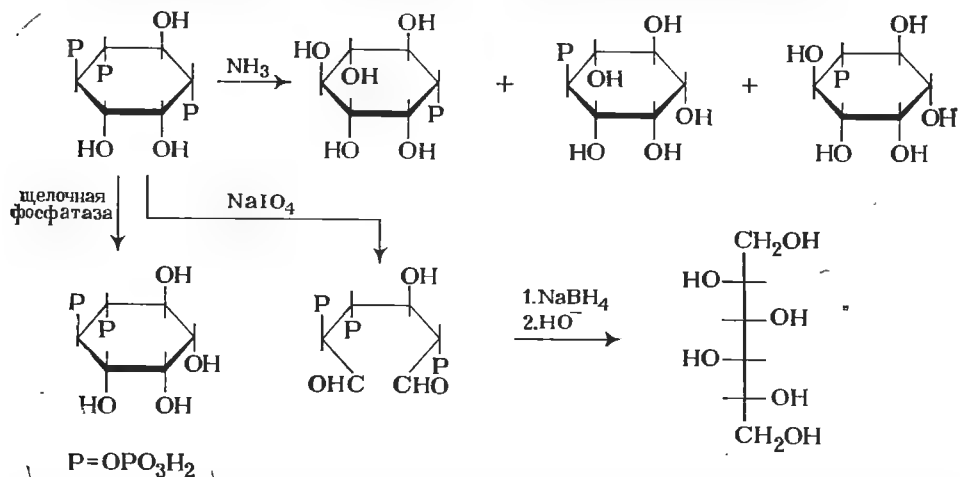
Схема II



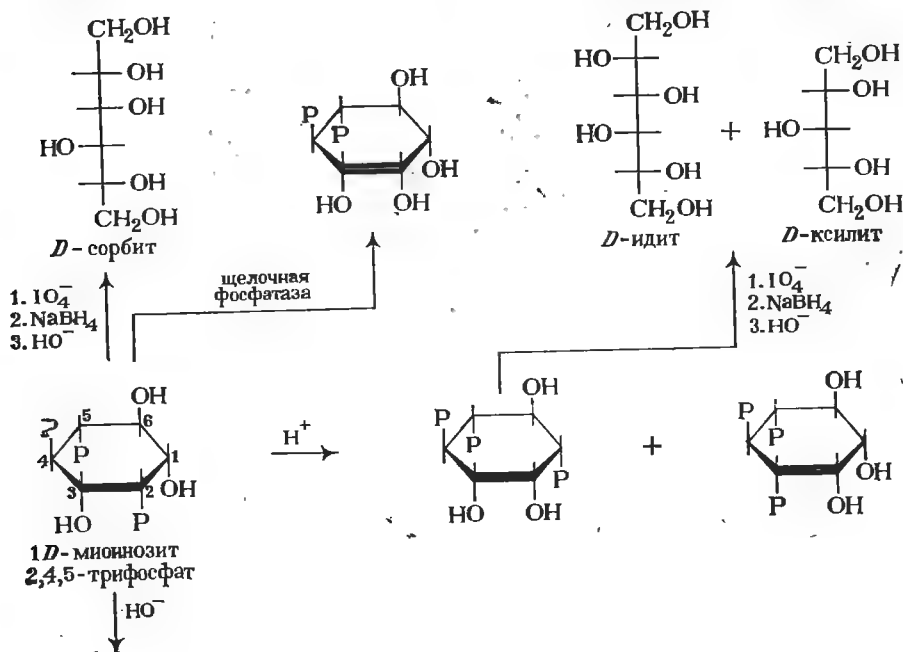
Этот миоинозитдифосфат обнаружил устойчивость к кислотнокатализируемой изомеризации, а сравнение его с синтетическим миоинозит-1,6-дифосфатом показало ряд отличий в химическом и хроматографическом поведении. На основании этих исследований ему была приписана структура 1D-миоинозит-4,5-дифосфата.

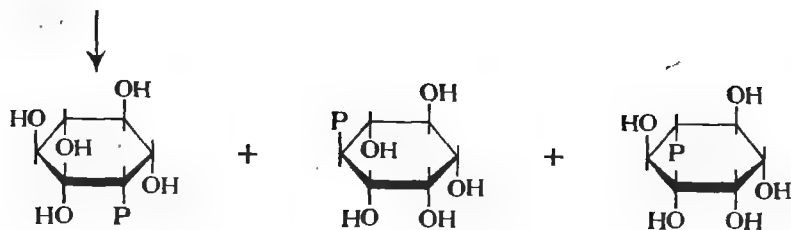
Наряду с инозитдифосфатами из продуктов щелочного гидролиза полифосфоинозитидов мозга быка выделены изомерные миоинозиттрифосфаты с удельным вращением соответственно $-27,4$ и $-15,3^\circ$. Получение D-идита в результате периодатного окисления одного из миоинозиттрифосфатов, последующего восстановления диальдегида и дефосфорилирования свидетельствовало о наличии двух фосфатных групп в положениях 1 и 4. Частичное ферментативное дефосфорилирование

приводило к образованию 4,5-дифосфата, а частичный щелочной гидролиз — к миоинозит-1-, миоинозит-4- и миоинозит-5-фосфатам:



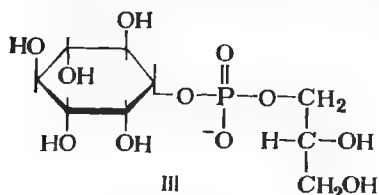
Указанные превращения дали возможность предложить для этого трифосфата структуру 1D-миоинозит-1,4,5-трифосфата. В случае второго миоинозиттрифосфата последовательное периодатное окисление, восстановление и дефосфорилирование дало *D*-сорбит, что указывало на структуру 2,3,5- или 2,4,5-трифосфата. Частичный ферментативный гидролиз трифосфата приводит к миоинозит-4,5-дифосфату, а щелочной гидролиз — к смеси миоинозит-2-, -4- и -5-фосфатов. В кислой среде исходный трифосфат изомеризуется в 1,4,5- и 3,4,5-трифосфаты. Последние превращаются соответственно в *D*-идит и *D*-ксилит в результате периодатного окисления, восстановления и дефосфорилирования:



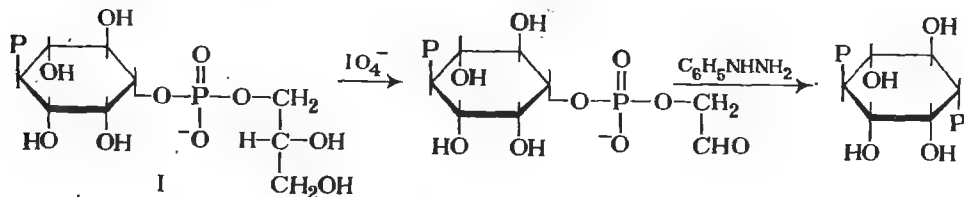


Таким образом показано, что данный трифосфат является 1*D*-миоинозит-2,4,5-трифосфатом.

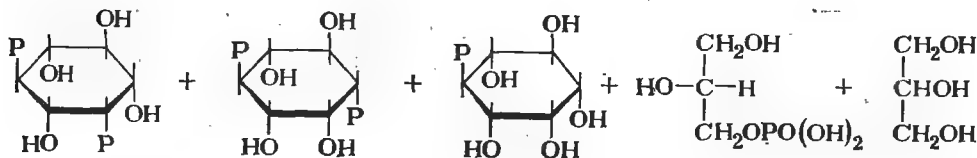
Вопрос о структуре ди- и трифосфоинозитидов (стр. 304) был окончательно решен при исследовании структуры глицерофосфорилмиоинозитди- и трифосфатов I и II, полученных деацилированием природных соединений действием гидроксилана [187]. Дифосфат I при действии щелочной фосфатазы дефосфорилируется в 1*D*-1-О-(глицерофосфорил)-миоинозит III, щелочной гидролиз дает смесь миоинозит-4-фосфата, миоинозит-1,4- и миоинозит-2,4-дифосфатов, глицерофосфата и глицерина. При периодатном окислении дифосфата I получают соответствующий альдегид, при действии на который фенилгидразина расщепляется фосфодиэфирная связь, что исключает изомеризацию фосфатных групп, и образуется миоинозит-1,4-дифосфат:



↑
щелочная
фосфатаза

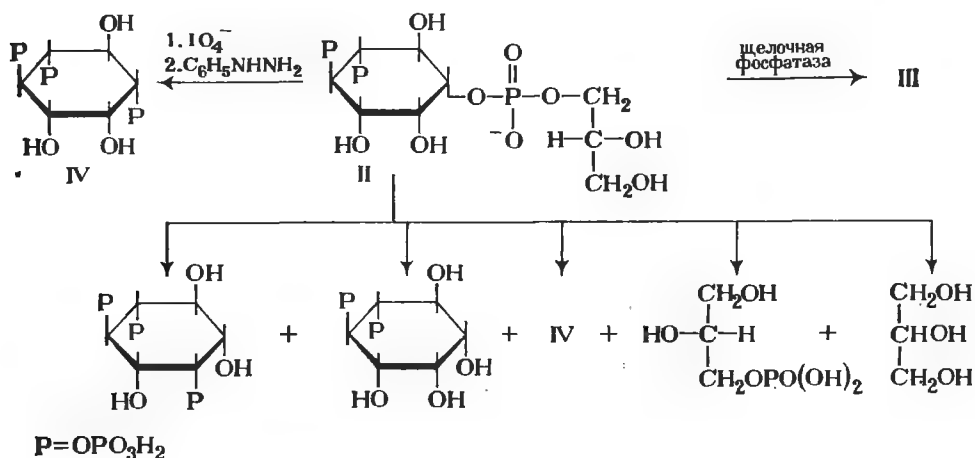


↓
NH₃

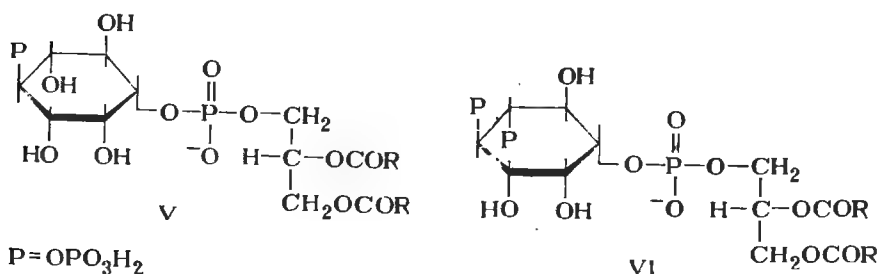


Данные превращения соответствуют структуре 1D-1-O-(глицерофосфорил)-миоинозит-4-фосфата.

Для установления строения глицерофосфорилмиоинозитдифосфата II применены аналогичные реакции; для него предложено строение 1D-1-O-(глицерофосфорил)-миоинозит-4,5-дифосфата:



На основании всех выполненных исследований природным ди- и трифосфоинозидами приписаны структуры 1D-1-O-фосфатидилмиоинозит-4-фосфата V и 1D-1-O-фосфатидилмиоинозит-4,5-дифосфата VI:

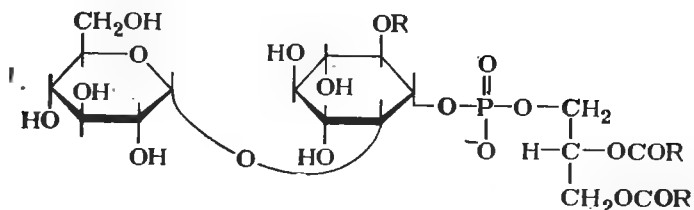


Сложные фосфоинозитиды. В растениях и микроорганизмах найдены сложные фосфоинозитиды, содержащие наряду с обычными компонентами (глицерин, инозит, фосфор, жирные кислоты) углеводные остатки, фитосфингозин, амины, аминокислоты и т. д.

Среди гликолипидов кислотоустойчивых бактерий, в частности в *Mycobacterium tuberculosis*, обнаружены моно-, ди-, три-, тетра-, пента- и гексаманнозилфосфатидилмиоинозиты.

Строение мономаннозилфосфатидилмиоинозита установлено традиционными методами, используемыми в химии углеводов, — метилированием и идентификацией полученного при метанолизе пентаметилмиоинозита. Таким образом было установлено, что остаток маннозы присоединен к миоинозиту в положении 2. На основании этих исследований природному соединению приписана структура 1D-1-O-фосфатидил-2-O-α-

D-маннопиранозилмиоинозита ($R=H$):



В случае диманнозида ($R=\alpha$ -*D*-маннопиранозил) второй остаток *D*-маннозы находится в положении 6 миоинозита, т. е. гликолипид является 1*D*-1-О-фосфатидил-2,6-ди-О-(α -*D*-маннопиранозил)-миоинозитом.

Три-, тетра-, пента- и гексаманнозилмиоинозиты также являются производными 2-О-маннозилмиоинозита и содержат в положении 6 миоинозита соответственно остатки ди-, три-, тетра- и пентасахаридов.

Выделены также соединения, у которых свободные ОН-группы остатков миоинозита или маннозы этерифицированы высшими жирными кислотами [188]. Из фосфолипидов сои и арахиса выделен инозитсодержащий липид, при гидролизе которого были получены инозитмо-нофосфат, глицерофосфат, галактоза, арабиноза, жирные кислоты, этаноламин. Из сои, кукурузы, арахиса, подсолнечника и семян других растений выделен инозитсодержащий фитогликолипид, в составе которого обнаружены фитосфингозин, жирные кислоты, фосфорная кислота, инозит, глюкозамин, гексуроновая кислота, галактоза, манноза и арабиноза.

Синтез фосфоинозитидов

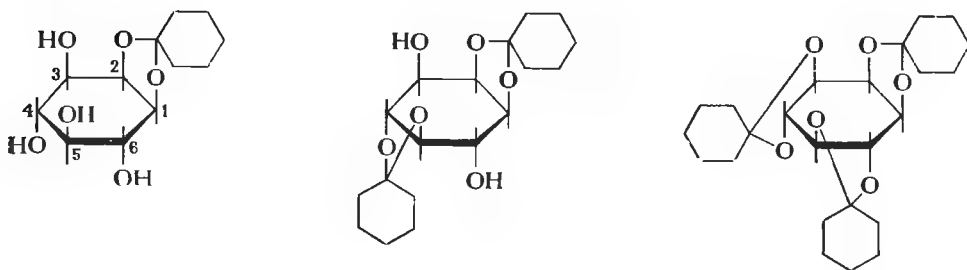
Основные трудности в синтезе фосфоинозитидов обусловлены необходимостью избирательного фосфорилирования миоинозита, в связи с чем возникает проблема селективной защиты гидроксильных групп в миоинозите.

При осуществлении синтеза этих соединений следует считаться с возможностью миграции фосфатного остатка [189], а также с ацильной миграцией [190] при использовании сложноэфирных защитных групп в миоинозитном кольце. К защитным группам предъявляется ряд требований: возможность селективного введения, удаление без разрыва фосфоэфирных связей и с сохранением функциональных групп в глицериновой половине молекулы.

В развитии синтетических исследований в области инозитфосфатидов можно отметить следующие основные этапы: 1) синтез рацемических замещенных миоинозитов и получение на их основе рацемических инозитфосфатидов различной структуры, 2) разработка методов получения оптически активных производных миоинозита и синтез оптически активных инозитфосфатидов.

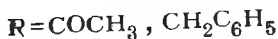
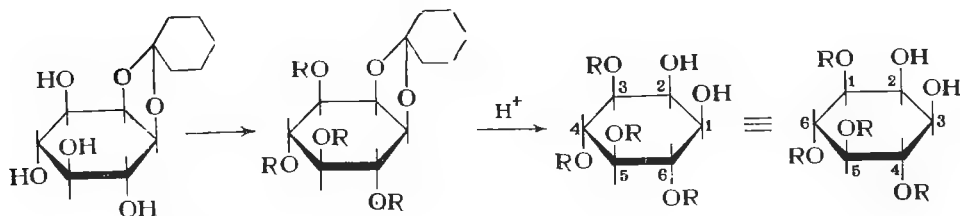
Синтез рацемических замещенных миоинозитов и инозитфосфатидов. Для защиты гидроксильных групп в молекуле миоинозита широко используют кетальные защитные группировки: изопропилиденую

[191, 192], циклогексилиденую [193]. При взаимодействии миоинозита с циклогексаном в присутствии *p*-толуолсульфокислоты получают моно-, ди- и три-О-циклогексилиденные производные, разделяемые хроматографическими методами:



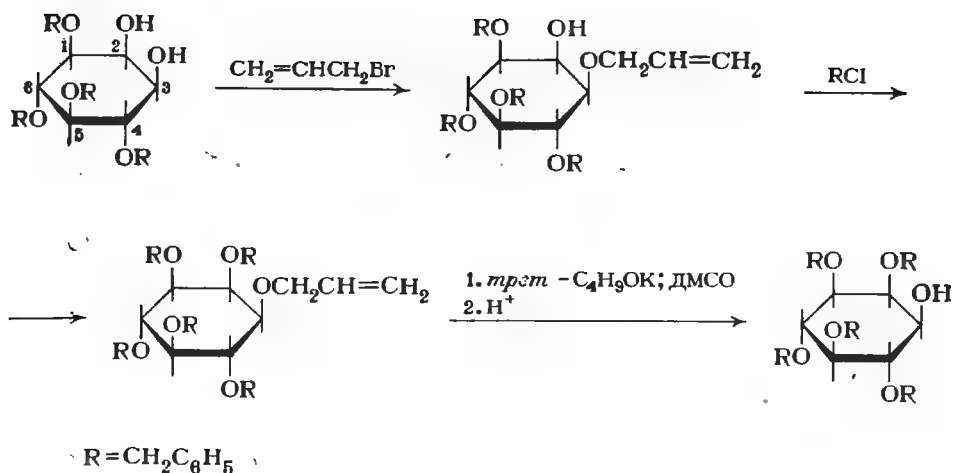
Следует отметить, что в первую очередь образуются ацетали и кетали по *цис*-гидроксильным группам, т. е. в положениях 1, 2 и 2, 3, а затем по *транс*-гидроксильным группам [193].

На основе *DL*-1,2-О-циклогексилиденмиоинозита достаточно просто получить *DL*-3,4,5,6-тетра-О-замещенные миоинозиты, в частности *DL*-3,4,5,6-тетра-О-бензил- или -тетра-О-ацетилмиоинозиты:

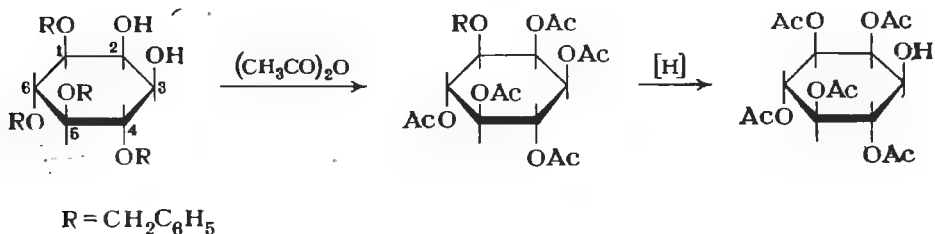


Был предпринят ряд попыток селективной защиты гидроксильной группы при C_2 *DL*-1,4,5,6-тетра-О-замещенных миоинозитов с учетом стереохимических различий между $\text{C}_{1(3)}$ (*e*) и C_2 (*a*). Однако оказалось, что ряд заместителей (Ac, Ts, $\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$, CH_3) [194] вводятся селективно в положение 1(3) вследствие больших стерических затруднений в положении 2, что приводит к *DL*-1,3,4,5,6-пента-О-замещенным миоинозитам. Таким образом, ни одна из указанных защит не может привести к *DL*-2,3,4,5,6-пентапроизводным миоинозита.

Получение *DL*-1,2,4,5,6-пента-О-бензилмиоинозита было осуществлено при помощи аллильной защиты [195], которая селективно вводится при C_3 *DL*-1,4,5,6-тетра-О-бензилмиоинозита. Полученный аллиловый эфир бензилировали в положение 2 и затем удаляли аллильную защиту кислотным гидролизом:

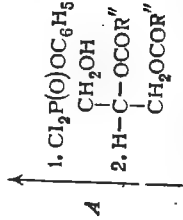
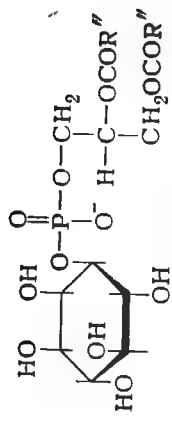
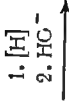
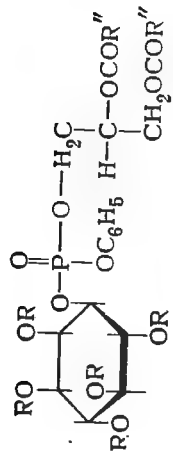


DL-1,2,4,5,6-Пента-О-ацетилмиоинозит также синтезируют на основе *DL*-1,4,5,6-тетра-О-бензилмиоинозита [196]. При ацетилизе последнего сохраняется бензильная группа у C₁ и получается *DL*-1-О-бензил-2,3,4,5,6-пента-О-ацетилмиоинозит, который после гидрогенолиза дает *DL*-1,2,4,5,6-пента-О-ацетилмиоинозит:

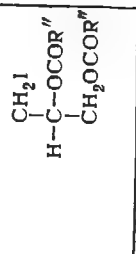
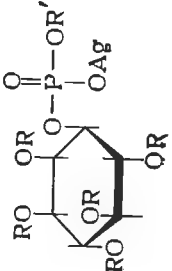
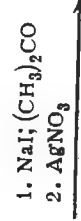
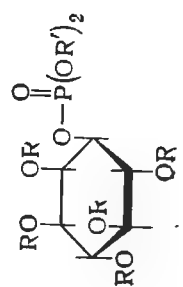
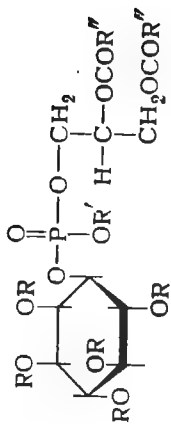
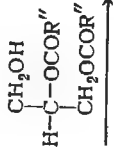
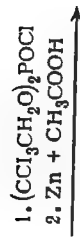
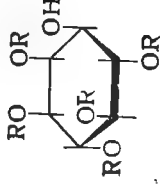


Полученный таким образом пентаацетилмиоинозит удобно применять в синтезе фосфоинозитидов в связи с возможностью удаления ацетильных групп гидролизом. Переход от *DL*-1,2,4,5,6-пента-О-замещенных производных миоинозита к монофосфоинозитидам осуществляется традиционными методами химии липидов [197]: А) хлорангидридным, Б) последовательным применением хлорангидридного метода при фосфорилировании пента-О-ацетил (или бензил) миоинозита ($\text{R} = \text{Ac}$, $\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$) и метода серебряных солей при присоединении глицеридной компоненты. В последнем случае при использовании ацильных защит возможен синтез ненасыщенного фосфатидилмиоинозита.

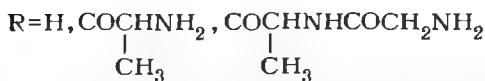
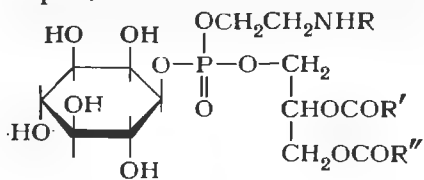
Лучшие результаты достигнуты при обращении к варианту Б, который предусматривает получение 1-фосфата *DL*-2,3,4,5,6-пента-О-бензилмиоинозита при фосфорилировании *DL*-1,2,4,5,6-пента-О-бензилмиоинозита ($\text{R} = \text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$) ди-(2,2,2-трихлорэтил)-хлорфосфатом и его последующую конденсацию с 1,2-диацилглицерином в присутствии 2,4,6-триизопропилбензолсульфохлорида [198]:



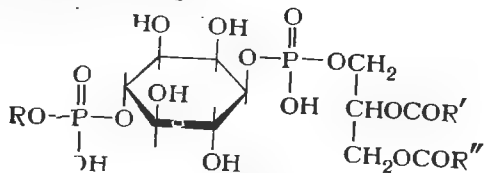
фосфатидилиинозит



содержащих аминокислоты, аминокислоты и пептиды:



Конденсацией *DL*-1,2,4,5-ди-*O*-циклогексиденмиоинозита с хлор-окисью фосфора и диглицеридом получены *DL*-1,4-дифосфоинозитиды ($R=H$, остаток диглицерида) [200]:

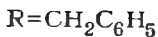
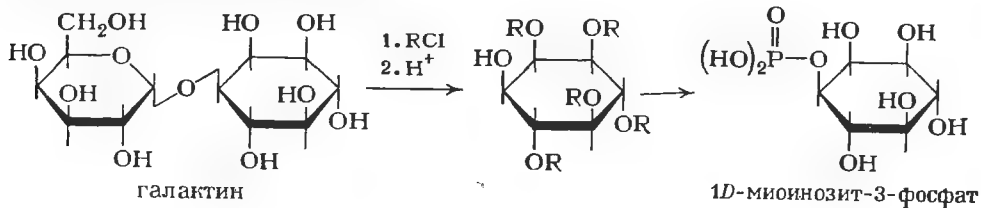


Синтез оптически активных фосфоинозитидов. Различные типы природных инозитфосфатидов обладают оптической активностью вследствие наличия фосфатидильного остатка у экваториального гидроксила при C₁, что делает молекулу асимметрично замещенной [201].

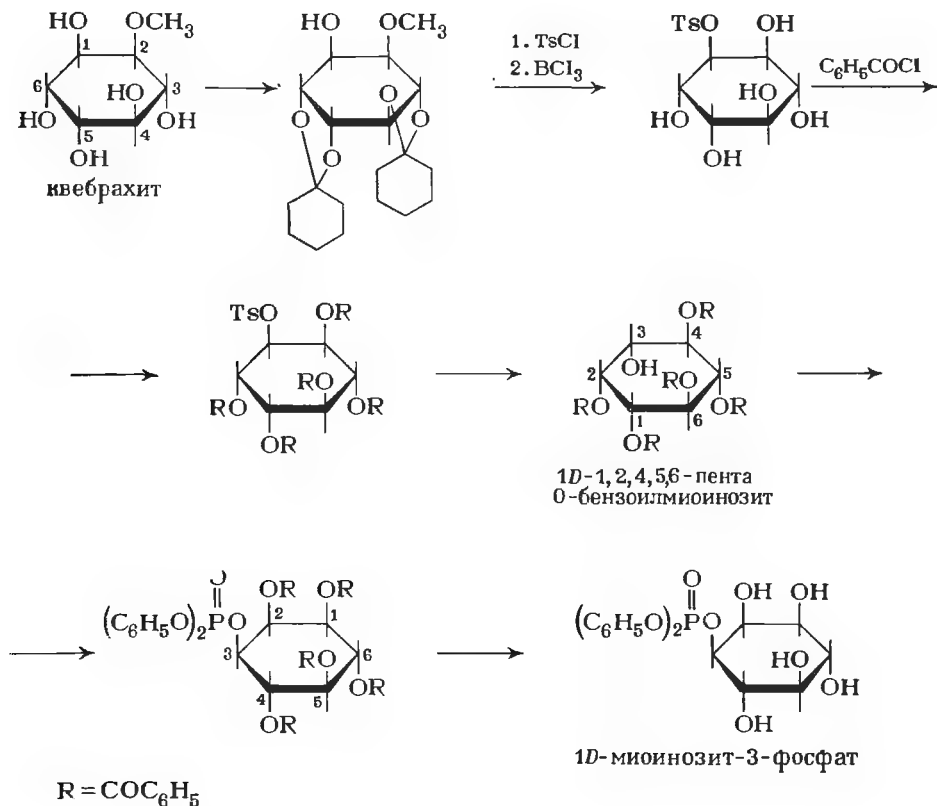
Синтез оптически активных фосфоинозитидов в основном сводится к получению оптически активных производных миоинозита, переход от которых к оптически активным фосфоинозитидам осуществляют с помощью методов синтеза рацемических соединений.

Для получения оптически активных производных миоинозита возможны принципиально различные методы. Одно направление включает использование природных веществ, содержащих миоинозит с элементами молекулярной асимметрии, и переход от них к асимметрично замещенным производным миоинозита нужной структуры. Другое направление основано на расщеплении на антиподы рацемических асимметрично замещенных миоинозитов, полученных на основе миоинозита.

В качестве оптически активного сырья по первому методу используют галактин [202], квебрахит [203], борнезит [204] и т. д. Так, оптически активный 1*D*-миоинозит-3-фосфат был получен на основе галактина через стадии бензилирования, кислотного гидролиза α-гликозидной связи, фосфорилирования 1*D*-1,2,4,5,6-*O*-бензилмиоинозита и удаления защитных групп [202]:



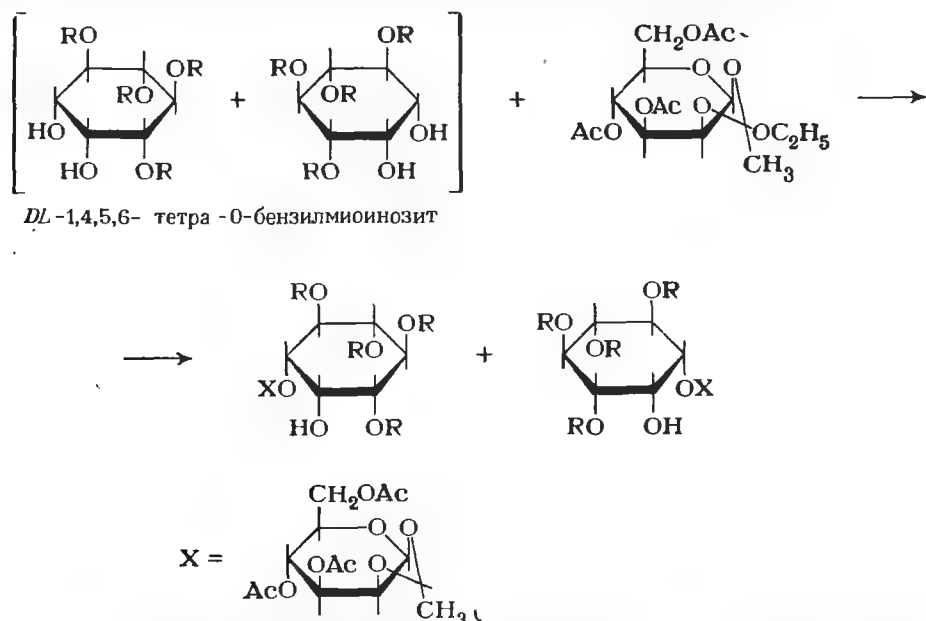
Синтез 1*D*-миоинозит-3-фосфата на основе квебрахита (1*D*-2-О-метилмиоинозита) включает получение 1*L*-3,4;5,6-ди-О-циклогексиден-квебрахита, тозилрование последнего и обработку тозилата треххлористым бором. Полученный 1*L*-1-О-тозилинозит бензоилировали и затем удаляли тозильный остаток (с обращением конфигурации при C₃), в результате чего был получен 1*D*-1,2,4,5,6-пента-О-бензоилмиоинозит, превращаемый известными методами в 1*D*-миоинозит-3-фосфат [203]:



На основе галактина и квебрахита получают лишь 1*D*-миоинозит-3-фосфат, от которого можно перейти только к 1*D*-3-фосфатидилмиоинозиту, т. е. к соединению с неприродной конфигурацией. К тому же, если учесть малую доступность природного сырья и трудоемкость описанных схем, то становится очевидным малая перспективность этого направления синтеза оптически активных фосфоинозитидов.

По-видимому, больших успехов следует ожидать в получении оптически активных производных миоинозита путем расщепления на антиподы рацемических асимметрично замещенных миоинозитов [205]. Для разделения рацемических асимметрично замещенных миоинозитов предложен способ, основанный на разделении диастереомерных ортоэфиров замещенной *D*-маннозы [206]. Сущность этого метода состоит в том, что *DL*-1,4,5,6-тетра-О-бензилмиоинозит подвергают реакции с орто-

эфиром ацелированной *D*-маннозы и полученные диастереомерные ортоэфиры разделяют кристаллизацией или хроматографией:



Образование ортоацетата с *D*-маннозой служит не только для расщепления рацемических соединений, но и для временной защиты гидроксильных групп в положениях 1 и 3 миоинозита.

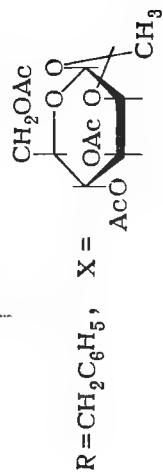
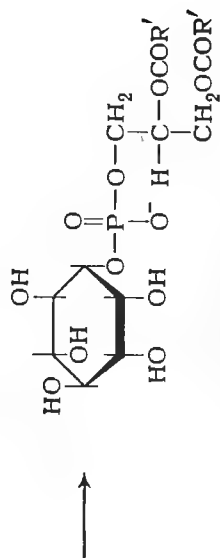
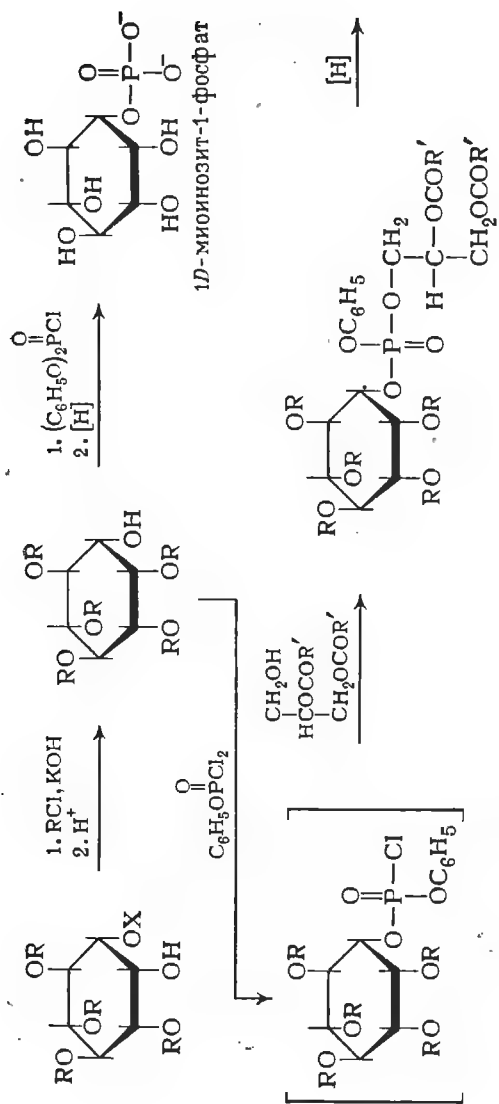
Далее выделенные ортоэфиры подвергали исчерпывающему бензилированию в присутствии щелочи и затем гидролизу в соответствующие пентабензиловые эфиры миоинозита [207].

При фосфорилировании 1*D*-2,3,4,5,6-пента-О-бензилмиоинозита дифенилхлорфосфатом с последующим удалением защитных групп гидрогенолизом получен 1*D*-миоинозит-1-фосфат [208] (см. стр. 317).

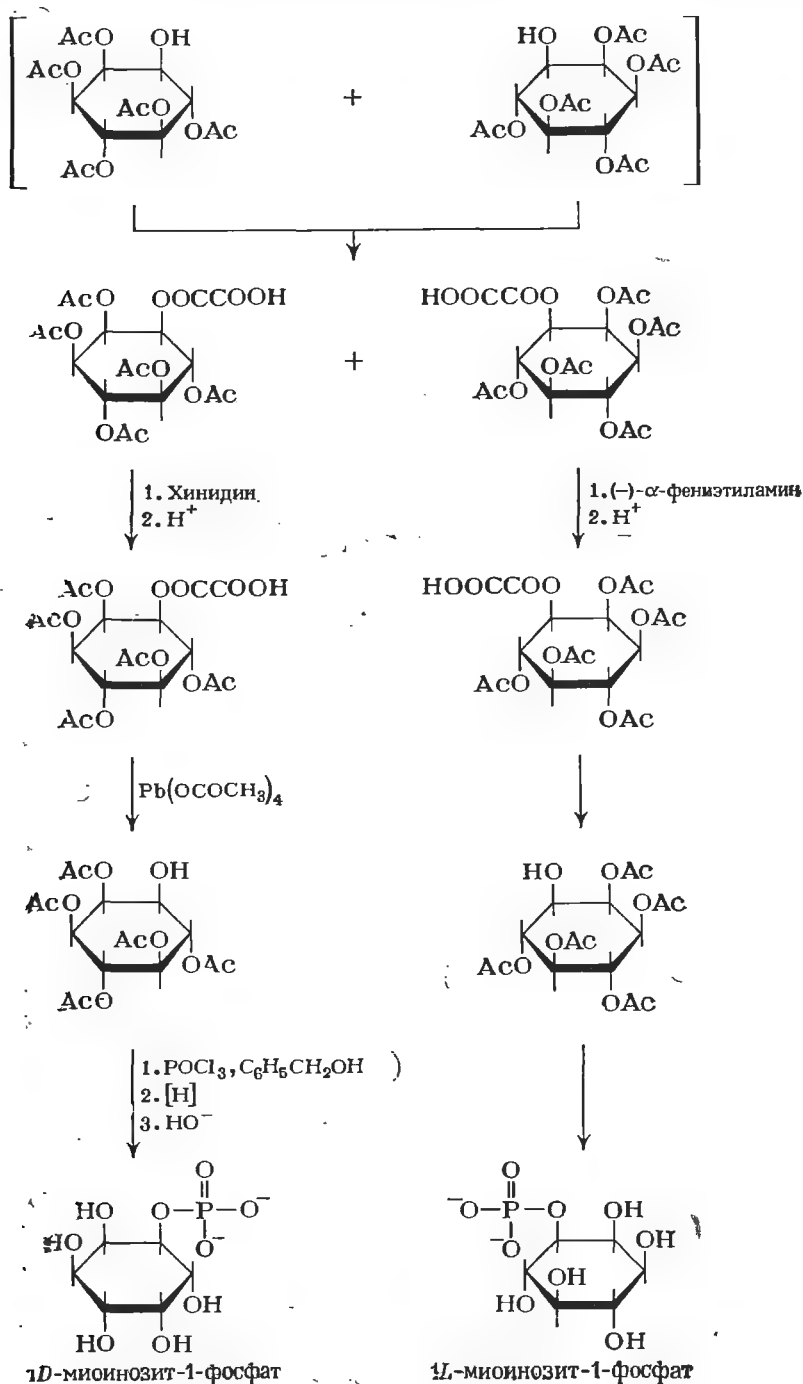
Полученный таким путем 1*D*-миоинозит-1-фосфат идентичен природному соединению, что свидетельствует о его оптической чистоте и применимости описанного метода для расщепления на антиподы асимметрично замещенных производных миоинозита. Для получения монофосфоинозитида пентабензиловый эфир конденсировали с фенолхлорфосфатом и 1,2-диацил-*sn*-глицерином и далее подвергали гидрогенолизу [206].

Описанный метод расщепления рацемических асимметрично замещенных производных миоинозита имеет общее значение: возможны его различные модификации путем варьирования методов защиты гидроксильных групп миоинозитного кольца, структуры ортоэфиров углеводов и т. д. [209].

Расщепление рацемического 1,2,4,5,6-пента-О-ацетилмиоинозита на энантиомеры осуществлено также через оксалаты, которые затем переводили в соли хинидина или (—)- α -фенилэтиламина [210]. Обработка солей кислотой дает соответственно 1*D*-О-оксалил-2,3,4,5,6-пента-О-ацетилмиоинозит и 1*L*-О-оксалил-2,3,4,5,6-пента-О-ацетилмиоинозит, а последующее окисление тетраацетатом свинца в присутствии ацетата



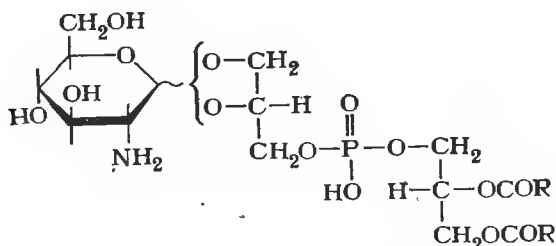
меди — соответственно 1*D*-2,3,4,5,6-пента-О-ацетилмиоинозит и 1*L*-2,3,4,5,6-пента-О-ацетилмиоинозит. Полученные на их основе энантиомерные 1*D*- и 1*L*-миоинозит-1-фосфаты по оптическим характеристикам соответствовали природным фосфатам:



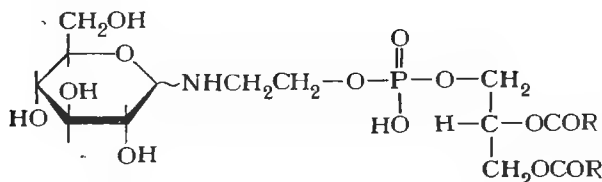
Гликофосфолипиды

Углевосодержащие фосфолипиды (гликофосфолипиды) обнаружены в различных тканях и продуктах животного и бактериального происхождения (мозг, печень, молоко, *Pseudomonas Diminuta*, *Streptococcus lactis* и др.) и микроорганизмах *Mycoplasma laidlawii*. В фосфолипид-углеводных комплексах ковалентная связь между фосфолипидом и углеводом может быть N-гликозидной, O-эфирной и фосфоэфирной.

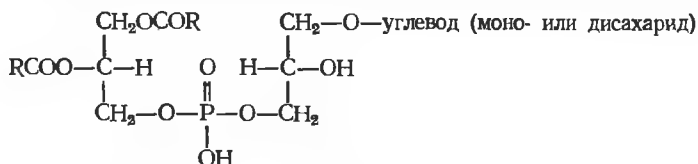
Так, из *Bacillus megaterium* выделены производные фосфатидилглицерина, содержащие остаток глюкозамина в положении 2' или 3':



В липопротеинах сливочного масла обнаружен N-(глюкозил)-фосфатидилэтаноламин:

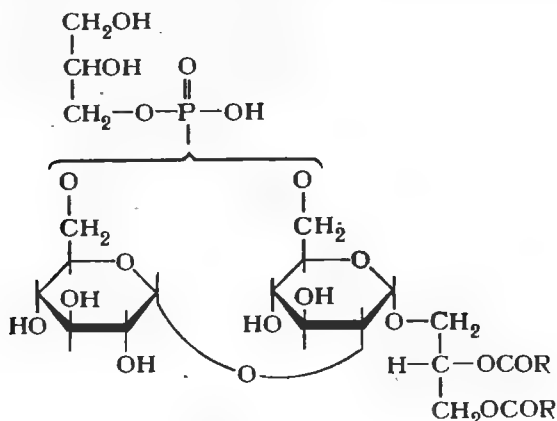


В бактериальных источниках (например, *Streptococcus hemolyticus* и др.) обнаружены производные фосфатидилглицерина, в которых углеводные компоненты присоединены O-эфирной связью:

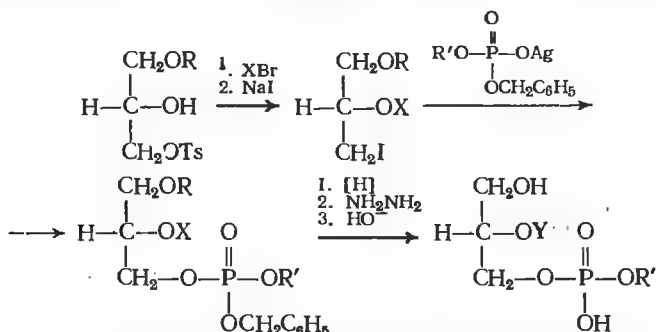


Для гликофосфолипидов с фосфоэфирной связью наиболее вероятным является присоединение фосфолипид к C₁ или C₆ углевода. В частности, для гликофосфолипидов, выделенного из *Mycoplasma laidlawii*, первоначально была предложена структура 1-фосфатидилглюкозы, однако позднее показано, что он имеет более сложную структуру и включает дисахарид — 2-O-(α-D-глюкопиранозил)-D-глюкозу, причем глице-

рофосфат присоединен к C₆ одного из остатков глюкозы, а диглицерид — к C₁ [211]:

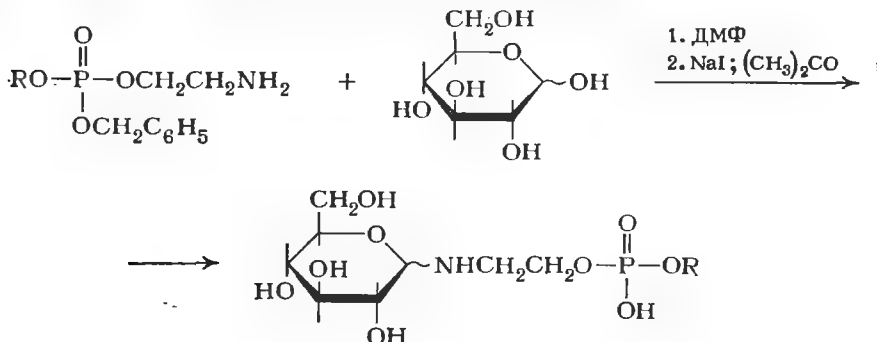


Для синтеза глюкозаминового производного фосфатидилглицерина [212] использована реакция Кенигса — Кнорра замещенного глюкозаминилбромидом и производного глицерина. Последующее введение фосфатидильного остатка может быть осуществлено обычными методами:



X = 2,4,6-три-О-ацетил-3-фталониламино-3-дезоксиглюкопиранозил,
Y = 3-амино-3-дезоксиглюкопиранозил, R' = 1,2-диацил-*sn*-глицерин

N-Глюкозилфосфатидилэтаноламин синтезирован конденсацией бензильного эфира фосфатидилэтаноламина с глюкозой [213]:

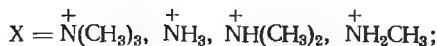


Для получения 1-фосфатидилглюкозы, выделенной из *Mycoplasma laidlawii*, применяется метод, основанный на конденсации 2,3,4,6-тетра-О-бензил(или ацетил)-*D*-глюкопиранозилбромидом с серебряной солью фосфатидовой кислоты с последующим удалением защитных групп [214]:



Фосфолипиды

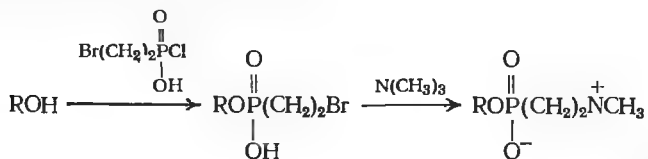
Фосфонолипиды — соединения, содержащие С—Р-связь, обнаружены в ряде морских организмов (моллюски, крабы, морская звезда и т. д.) и некоторых видах низших животных.



$R, R' =$ ацил, алкил

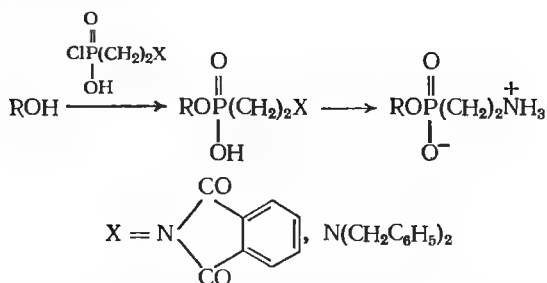
Синтез фосфолипидов с различным набором гидрофобных и гидрофильных компонент не представляет больших трудностей и, как правило, осуществляется взаимодействием диацил-, диалкил- или ацилалкилглицеринов с хлорангидридом замещенной фосфоновой кислоты [128]. В зависимости от типа получаемого фосфолипида используют различные фосфонирующие агенты.

Так, при синтезе лецитинфосфонатов фосфонилирование проводят 2-бромэтилхлорфосфонатом с последующей обработкой фосфонового производного триметиламином [215]:

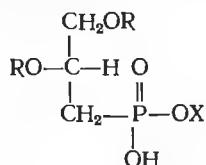


При получении фосфоновых аналогов кефалина фосфонилирование обычно осуществляют 2-фталимидоэтилхлорфосфонатом [216] (в неко-

торых случаях применяют и дихлорид) или 2-(N,N-дибензиламино)-этилхлорфосфонатом:

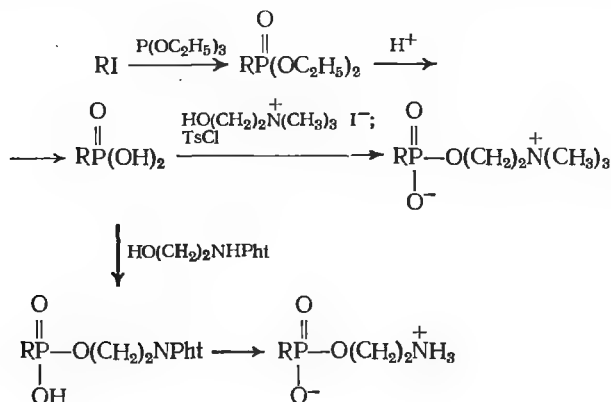


Синтезирована также группа фосфолипидов, которые можно рассматривать как производные 1,2-пропандиола и фосфоновой кислоты, содержащей азотистое основание:



R = ацил, алкил; X = азотистое основание

Эти соединения в природе не обнаружены, но представляют интерес как ингибиторы различных фосфолипаз; их получают по следующей схеме:

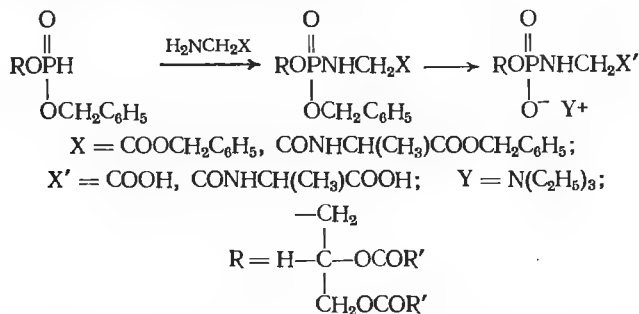


Аминокислотные и пептидные производные фосфолипидов

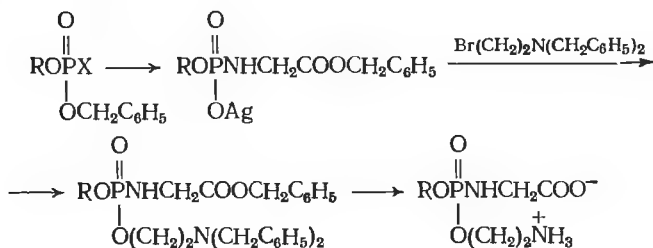
В настоящее время допускают возможность присутствия ковалентных связей между липидной и белковой компонентами в липопротеинах. Были высказаны предположения о присоединении аминокислот и пептидов к глицерофосфолипидам посредством фосфамидной и ацилфосфатной связей.

Синтез фосфатидиламинокислот [217] и фосфатидилпептидов с фосфамидной связью осуществлен взаимодействием 1,2-диацил-*sn*-глицеро-

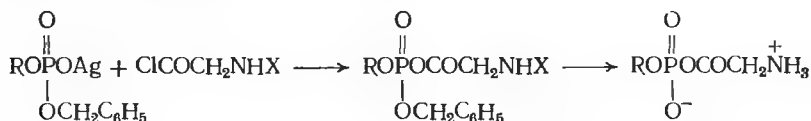
3-(О-бензил)-фосфитов с защищенной аминокислотой или пептидом с последующим удалением защитных групп:



Синтез N-глицилфосфатидилэтаноламина осуществлен по следующей схеме:

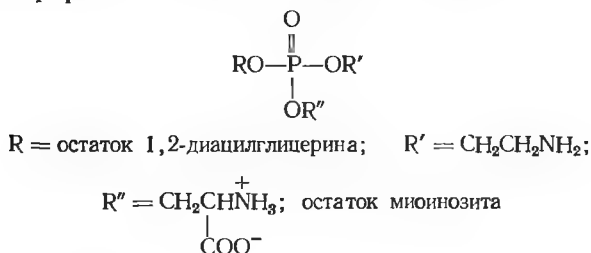


О-Глициновое производное фосфатидовой кислоты с ацилфосфатной связью получено при взаимодействии серебряной соли фосфатидовой кислоты с хлорангидридом защищенного глицина с последующим удалением защитных групп:



Показано, что фосфолипиды с ацилфосфатной и фосфамидной связями легко гидролизуются даже в слабокислых средах, т. е. они значительно лабильнее классических фосфолипидов.

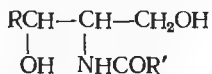
Предполагают также, что в природных источниках фосфолипиды могут присутствовать в виде триэфиров фосфорной кислоты. С использованием традиционных методов химии липидов были синтезированы различные триэфиры:



СФИНГОЛИПИДЫ

Сложные эфиры, содержащие алифатические аминоспирты типа сфингозина, — сфинголипиды — стали в последние годы предметом пристального изучения в связи с выяснением структуры и роли разнообразных клеточных мембран, важнейшей составной частью которых они являются. Это типичные компоненты высокоорганизованных тканей, особенно нервной системы; их накопление в мозге, например, связано с процессом миелинизации, без которого невозможен переход от рефлекторных реакций к высшим формам нервной деятельности. Сфинголипиды содержатся в сером и белом веществах головного мозга, оболочках аксонов периферической нервной системы, мембранах эритроцитов, плазме крови, печени, легких, селезенке, почках и других жизненно важных органах.

Во всех природных сфинголипидах аминогруппа основания ацилирована жирной кислотой. N-Ацильные производные сфингозиновых оснований носят название «церамиды»:

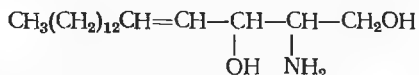


Сфинголипиды являются церамидами, у которых замещена первичная гидроксильная группа. В зависимости от характера заместителя в положении 1 различают две наиболее многочисленные группы сфинголипидов: фосфорсодержащие сфинголипиды и гликосфинголипиды.

СФИНГОЗИНОВЫЕ ОСНОВАНИЯ

Строение и номенклатура

Сфингозиновые основания, являющиеся характерными структурными компонентами всех сфинголипидов растительного и животного происхождения, представляют собой алифатические аминоспирты, отличающиеся друг от друга длиной и строением углеводородной цепи, наличием или отсутствием двойных связей и числом гидроксильных групп. Наиболее широко распространенное основание — сфингозин

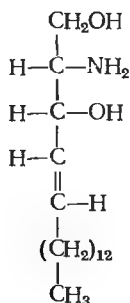


Установление строения сфингозина оказалось довольно трудоемкой задачей: между выделением сфингозина из церебровидов мозга в 1882 г. и окончательным доказательством его структуры как 2-амино-1,3-диоксиконтадецена-4 прошло около 70 лет.

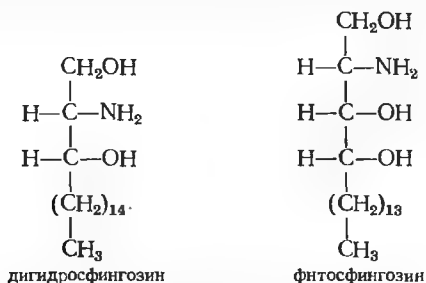
Сфингозин содержит два асимметрических атома углерода и двойную связь, что приводит к возможности существования для него восьми пространственных изомеров: *D*- и *L*-трео- и *D*- и *L*-эритро, каждый из которых может быть *цис*- или *транс*-. При изучении ИК-спектров сфингозина была установлена *транс*-конфигурация двойной связи в положении 4, что существенно отличает сфингозиновые основания от большинства высших жирных ненасыщенных кислот, встречающихся в липидах.

Относительная конфигурация атомов C₂ и C₃ была установлена сравнением свойств диастереомерных α-амино-β-оксистеариновых кислот со свойствами треонина и аллотреонина [218, 219].

эритро-α-Амино-β-оксистеариновая кислота при восстановлении дала аминодиол, идентичный продукту гидрирования природного сфингозина. *эритро*-Конфигурация заместителей при C₂—C₃ в сфингозине была подтверждена стереоспецифическим синтезом [220]. Таким образом установлено, что сфингозин представляет собой *D-эритро*-2-амино-1,3-диокси-*транс*-октадецен-4:



Насыщенный аналог сфингозина — дигидросфингозин (*D-эритро*-2-амино-1,3-диоксиоктадекан) — найден в природных источниках значительно позднее, чем сфингозин; в небольших количествах он сопутствует сфингозину во всех сфинголипидах природного происхождения.



В растительных сфинголипидах главным аминоспиртом сфингозиновой природы является фитосфингозин (церебрин), являющийся 2-амино-1,3,4-триоксиоктадеканом. В последнее время фитосфингозин был обнаружен в сфинголипидах мозга и почек человека.

Из-за наличия в молекуле фитосфингозина дополнительного асимметричного атома углерода (C₄) для него возможны восемь пространственных изомеров, т. е. он может принадлежать к *рибо*-, *арабино*-, *ликсо*- или *ксило*-ряду.

Путем периодатного окисления N-бензоилпроизводного фитосфингозина до N-бензоил-*L*-серина установлено, что атом C₂ фитосфингозина относится к *D*-ряду. Анализ других продуктов окисления и данных по N → O-ацильной миграции в N-бензоилангидрофитосфингозине позволил отнести природный фитосфингозин к *D-рибо*-ряду. Окончательное доказательство правильности сделанного отнесения было получено после проведения стереоспецифического синтеза.

В настоящее время благодаря применению новых методов анализа сфингозиновых оснований и их производных, таких, как различные виды распределительной и газо-жидкостной хроматографии, а также масс-спектрометрии, наши представления о сфингозиновых основаниях значительно расширились. В природных сфинголипидах обнаружены многочисленные гомологи сфингозина, дигидросфингозина и фитосфин-

гозина с длиной углеродной цепи от 12 до 20 атомов углерода, найдены основания с двумя двойными связями, ненасыщенные фитосфингозины, а также основания с разветвленной углеводородной цепью. Оказалось, что сфингозиновые основания представляют собой целую группу родственных соединений, насчитывающую более пятидесяти отдельных представителей. Набор сфингозиновых оснований меняется в широких пределах в зависимости от источника выделения. В характере этого распределения отмечены некоторые филогенетические закономерности. Так, например, при переходе от высших животных к низшим увеличивается содержание насыщенных оснований и оснований с более короткой цепью.

Из-за быстрого увеличения числа сфингозиновых оснований традиционная номенклатура этих соединений, основанная на исторически сложившихся тривиальных названиях, стала громоздкой и противоречивой, поэтому в 1967 г. была предложена новая полусистематическая номенклатура липидов, в том числе и сфинголипидов [221]. В качестве ключевого соединения для сфинголипидов избран дигидросфингозин (*D-эритро-2-амино-1,3-диоксиоктадекан* или *2S,3R-2-амино-1,3-диоксиоктадекан*), названный «сфинганином». В этом названии отражены не только положение заместителей и длина углеводородной цепи, но и *D-эритро-конфигурация* заместителей при атомах C_2-C_3 . Для обозначения высших и низших гомологов дигидросфингозина используют приставки, производящиеся от названия углеводорода, который имеет то же число атомов углерода, что и основание. Например, C_{14} -гомолог дигидросфингозина называют по этим правилам тетрадекасфинганином. Если основание имеет по сравнению с дигидросфингозином дополнительный заместитель, то место замещения указывается цифрой, а конфигурация при этом углеродном атоме буквами *D-* или *L-*, следующими за этой цифрой. Если конфигурация неизвестна, ставится знак *X*. Например, название 4-*X*-оксигептадекасфинганин означает C_{17} -гомолог фитосфингозина с неизвестной конфигурацией при C_4 . Сфингозин по этой номенклатуре предложено называть 4-сфинганином, а его ненасыщенные гомологи со второй двойной связью в цепи — сфингадиенинами. Если вторая двойная связь имеет *цис-* или неизвестную конфигурацию, это должно быть специально отмечено, например 4,14-*цис*-сфингадиенин — сфингозин с *цис*-двойной связью в положении 14 алифатической цепи.

Специальному обсуждению при введении новой номенклатуры подверглись способы обозначения конфигурации при асимметрических углеродных атомах. Обозначения *D-* и *L-* менее универсальны, чем система *R* и *S* Кана — Инголда — Прелога. Однако последняя признана менее пригодной для случая сфинголипидов, так как, например, атом C_3 в сфингозине формально имеет *R*-конфигурацию, а в фитосфингозине — *S*-конфигурацию, т. е. при одной и той же действительной конфигурации происходит ее формальное обращение. В связи с этим предложено использовать обозначения *D-* и *L-*, а в случае рацемических соединений — приставку «*rac*».

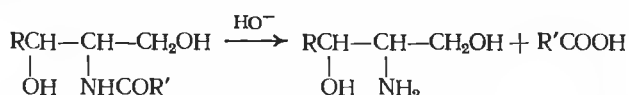
В работах по биохимии сфинголипидов принято использовать еще более лаконичные условные обозначения сфингозиновых оснований. Эти обозначения напоминают сокращения для жирных кислот и содержат латинские буквы *d* (диокси) или *t* (триокси), двузначную цифру (например, 18), равную числу углеродных атомов в цепи основания, и через двоеточие однозначную цифру, фиксирующую степень ненасыщен-

ности, т. е. число двойных связей. Например, 4-окси-8-сфингенин (дегидрофитосфингозин) может быть обозначен как *t18:1*.

В случае сфингозиновых оснований с разветвленной цепью углеродных атомов разветвление, как правило, находится при предпоследнем углеродном атоме (*iso*-основания) или у третьего атома с конца цепи (*anteiso*-основания). Это также принято отмечать в сокращенном обозначении, например: *iso-d15:1*, *anteiso-t19:1*.

Выделение и идентификация сфингозиновых оснований

Сфингозиновые основания выделяют после кислотного или щелочного гидролиза сфинголипидов [222]. При используемых до настоящего времени методах гидролиза возможны большие потери оснований, особенно минорных компонентов, вследствие побочных реакций распада, перегруппировок и конденсаций. Более высокие выходы оснований дает кислотный гидролиз, который, однако, сопровождается образованием значительного количества побочных продуктов (см. стр. 332). Наиболее распространенным приемом, который дает возможность получить четкие количественные результаты и свести к минимуму нежелательные побочные реакции, является гидролиз 1 н. водно-метанольным раствором соляной кислоты [222]. Щелочной гидролиз с помощью метанольного или этанольного растворов щелочей мало эффективен и дает низкие выходы оснований, хотя и свободен от побочных превращений. В последние годы для выделения сфингозиновых оснований предложен двухстадийный метод. На первой стадии — ферментативной — сфинголипиды превращают в продукт частичного гидролиза — N-ацилированное основание (церамид), который затем подвергают щелочному гидролизу [223]:



Для дальнейшего снижения потерь оснований необходима разработка количественного, возможно ферментативного, метода расщепления амидной связи. Однако ферменты нужного типа пока еще недостаточно доступны.

Сфингозиновые основания экстрагируют из гидролизатов (после предварительной нейтрализации растворов и удаления жирных кислот или их метиловых эфиров с помощью петролейного эфира) такими растворителями, как эфир, хлороформ, этилацетат или их смеси.

В ранних работах остаток после удаления растворителей растворяли в спирте, основания осаждали и очищали в виде сульфатов, которые могут быть разделены фракционной кристаллизацией. Так, например, сульфат сфинганина значительно менее растворим, чем сульфат 4-сфингенина. Для более детальной идентификации свободные основания переводили в производные (N-ацетильные и N-бензильные, а также триацетаты и трибензоаты), которые прекрасно кристаллизуются. Для производных природных оснований, кроме того, характерны весьма высокие значения углов удельного вращения плоскости поляризации.

В последнее время в связи с открытием большого числа новых, очень близких по свойствам сфингозиновых оснований эти относительно грубые методы очистки и идентификации практически полностью вы-

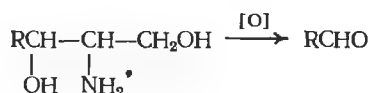
теснены хроматографическими методами. Для разделения и идентификации сфингозиновых оснований применяют тонкослойную хроматографию на кремневой кислоте с гипсом и на окиси алюминия, бумажную хроматографию, газо-жидкостную хроматографию и масс-спектрометрию.

Тонкослойная хроматография. Для тонкослойной хроматографии свободных оснований применяют кремневую кислоту, содержащую от 5 до 15% гипса и активированную нагреванием до 105—120 °С. В качестве растворителей используют смеси хлороформа с метанолом, полярность которых увеличивают добавлением воды, уксусной кислоты или раствора аммиака.

Для разделения сложных смесей оснований более эффективным оказалось хроматографирование их динитрофенильных производных. В отличие от свободных оснований динитрофенильные производные хорошо хроматографируются на окиси алюминия, содержащей 15% гипса. При применении системы хлороформ — метанол (98:2) основания разделяются по степени ненасыщенности, затем на той же пластинке, предварительно импрегнированной тетралином, проводят хроматографирование в перпендикулярном направлении, достигая разделения гомологов с одинаковой степенью ненасыщенности. Описана также тонкослойная хроматография свободных оснований и их динитрофенильных производных на кремневой кислоте с гипсом, импрегнированной боратами или нитратом серебра.

Бумажная хроматография. Бумажная хроматография свободных оснований применяется редко из-за менее удовлетворительных по сравнению с тонкослойной хроматографией результатов. Эффективное разделение достигнуто при хроматографировании динитрофенильных производных оснований на бумаге, импрегнированной тетралином и кремневой кислотой.

Газо-жидкостная хроматография. В 1959 г. разработан метод идентификации смеси оснований с помощью газо-жидкостной хроматографии. Смесь оснований, выделенных при гидролизе сфинголипидов, предварительно хроматографически очищали от метиловых эфиров жирных кислот и окисляли периодной кислотой или тетраацетатом свинца:

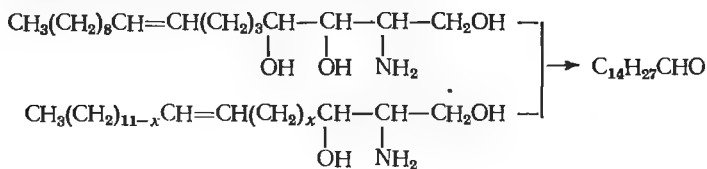


Полученную смесь альдегидов разделяли и идентифицировали с помощью газо-жидкостной хроматографии.

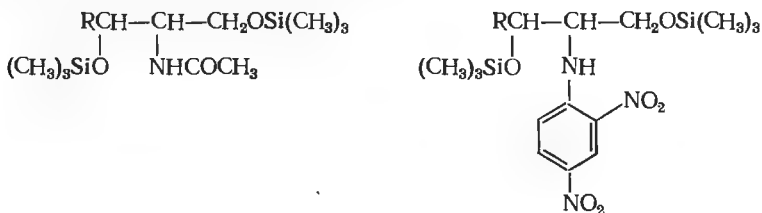
Этот метод был впоследствии модифицирован: альдегиды разделяли в виде их диметилацеталей или окисляли до кислот. Смесь жирных кислот разделяли в виде их метиловых эфиров или восстанавливали и разделяли образующиеся при этом спирты.

Однако разделение смеси альдегидов, даже проведенное количественно, еще не полностью характеризует исходную смесь оснований. Дело в том, что одни и те же альдегиды могут быть продуктом расщепления разных оснований. Например, альдегид состава C_{15:1} может со-

ответствовать как 4-окси-8-сфингенину, так и гептадекасфингенину с неизвестным положением двойной связи:



В 1965 г. был предложен способ прямого анализа смеси оснований с помощью газо-жидкостной хроматографии их триметилсилильных производных. В отличие от периодатного окисления этот метод позволяет разделять сами основания, а не продукты их деградации. Свободные основания можно затем легко выделить мягким гидролизом. Эффективность разделения триметилсилильных производных в зависимости от длины цепи довольно велика, однако недостаточна при разделении по степени ненасыщенности, кроме того, плохо выявляются разветвленные основания. Более удобным оказалось использование триметилсилильных производных не самих оснований, а их N-ацетильных или N-динитрофенильных производных:



Для определения положения двойной связи в цепи смесь оснований перед силилированием обрабатывают OsO_4 (гидроксилирование двойной связи).

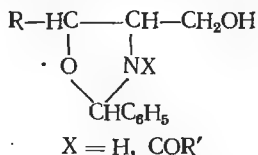
Наиболее полную информацию можно получить при сочетании газо-хроматографического разделения с последующей масс-спектрометрией индивидуальных триметилсилильных производных. В дополнение к определению длины цепи и степени ненасыщенности неизвестного основания масс-спектрометрические данные дают информацию для классификации его по аминодиольному и аминотриольному типам. Положение двойной связи в алифатической цепи оснований определяют по характеристической масс-спектрометрической фрагментации между виндикальными О-триметилсилильными группами, которые появляются в молекуле после обработки смеси оснований OsO_4 и силилирования.

Для более точного и полного анализа смеси гомологичных оснований используют комбинацию приведенных выше методов.

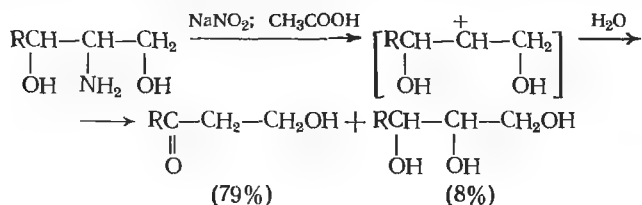
Химические свойства сфингозиновых оснований

Все сфингозиновые основания содержат весьма реакционноспособную аминогруппу, которая может быть селективно проацилирована [224] или использована для образования солей с сильными кислотами, а также первичную и вторичные гидроксильные группы.

Присутствие в положениях 2 и 3 сфинголипидных оснований амино- и гидроксильной групп в *эритро*-конфигурации позволяет получить ряд циклических производных типа оксазолидинов:

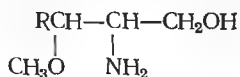


При дезаминировании сфинганина протекает пинаколиновая перегруппировка с образованием соответствующего кетона:

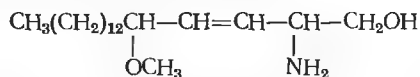


Реакционная способность первичных гидроксильных групп во всех основаниях равноценна, а поведение вторичных гидроксильных групп весьма существенно зависит от структуры радикала. Особенно наглядно эти различия проявляются у 4-сфингенина и сфинганина.

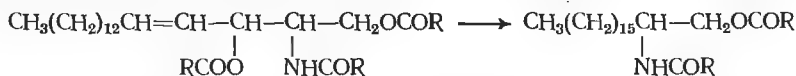
При метанолизе природных сфинголипидов в кислой среде в качестве побочных продуктов выделяют 3-О-метилловые эфиры оснований:



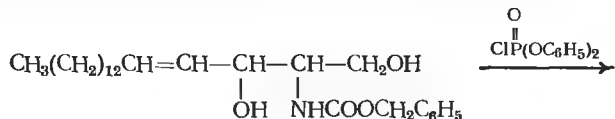
В случае 4-сфингенина образуются два О-метилловых эфира, причем один из них, присутствующий в большем количестве, является 5-О-метилловым эфиром — продуктом аллильной перегруппировки исходного основания в условиях метанолиза:

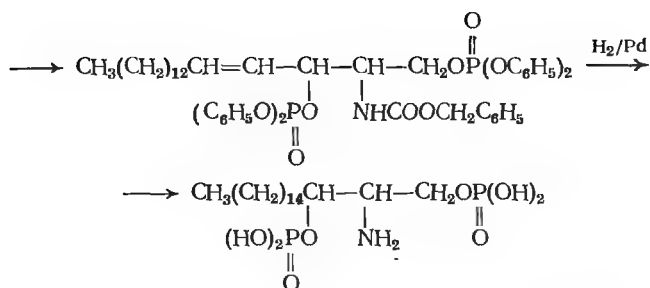


Аллильный характер гидроксила при C_3 в 4-сфингенине проявляется при гидрировании триацильных производных основания; при этом не только гидрируется двойная связь, но и элиминируется ацилоксигруппа с образованием диацилсфингина:

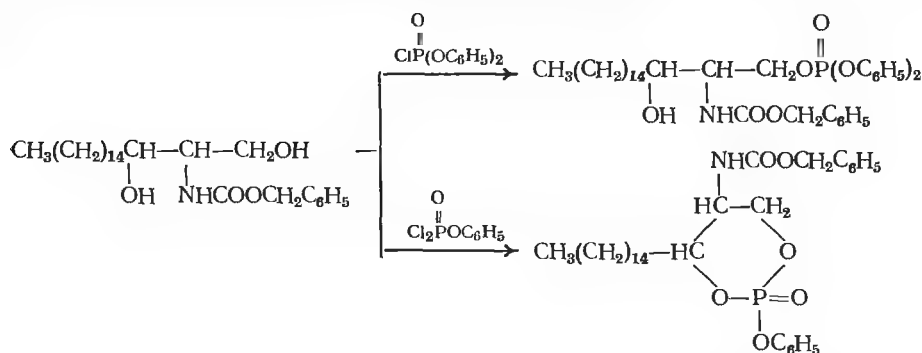


При фосфорилировании N-карбобензоксисфинганин и 4-сфингенин ведут себя по-разному. Производное 4-сфингенина дает дифосфаты



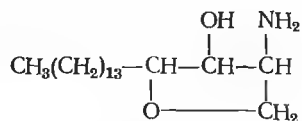


а производное сфинганина монофосфат или циклофосфат в зависимости от применяемого фосфорилирующего средства:

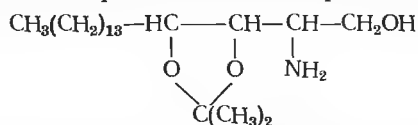


Кроме того, установлено, что в том случае, когда в 4-сфингенине не блокированы вторичная гидроксильная и аминогруппы, при стоянии или хроматографировании в присутствии таких растворителей, как хлороформ или метанол, а также при длительном хранении в кристаллическом виде образуется ряд продуктов деградации (до пяти компонентов). Сфинганин таких превращений не испытывает.

Наличие в 4-оксисфинганине третьей гидроксильной группы сказывается на его свойствах. При выделении оснований метанолизом в кислой среде кроме 4-оксисфинганина выделяют его ангидропроизводное:

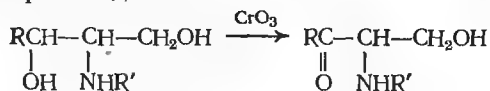


Присутствие 3,4-гликольной группировки в 4-оксисфинганине дает возможность получать изопропилиденовые производные:



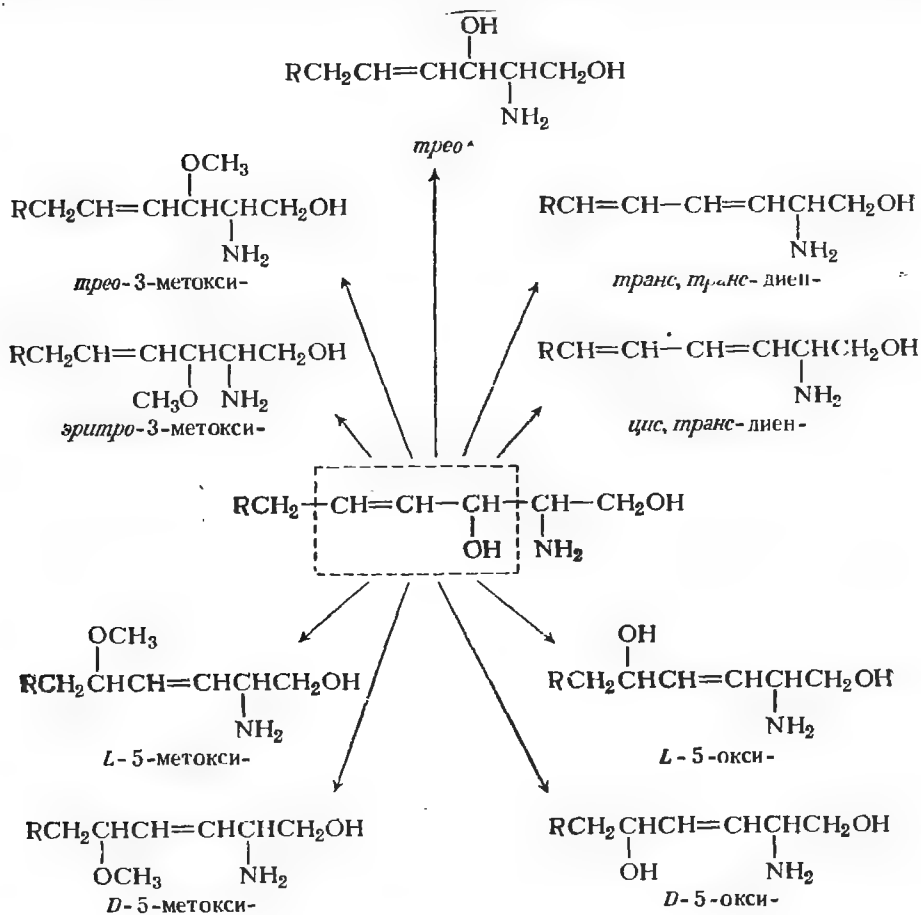
Наличие в сфингозиновых основаниях заместителей при соседних атомах углерода сказывается на их поведении при окислении, поэтому при установлении их структуры широко используется периодатное окисление.

Окисление N-замещенных оснований CrO_3 в уксусной кислоте приводит к 3-дегидропроизводным:

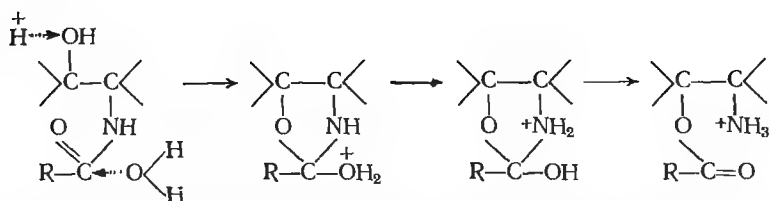


При работе с ацилированными аминоспиртами, в частности с сфинголипидами, необходимо учитывать возможность $\text{N} \rightleftharpoons \text{O}$ -ацильных миграций, направление которых зависит от pH среды. Скорость $\text{N} \rightleftharpoons \text{O}$ -переходов различна: $\text{N} \rightarrow \text{O}$ -ацильная миграция протекает частично и с малой скоростью, в то время как $\text{O} \rightarrow \text{N}$ -миграция идет быстро и почти количественно.

Химические превращения, которые может претерпевать 4-сфингенин в кислой среде [223] благодаря наличию в его молекуле аллильной группировки и возможности $\text{N} \rightarrow \text{O}$ -ацильных миграций, показаны ниже:



$\text{N} \rightarrow \text{O}$ -Миграция у эритро-аминоспиртов может протекать по двум направлениям: с сохранением конфигурации и, в более жестких условиях, с частичным обращением конфигурации:

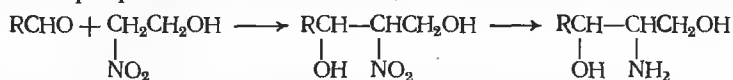


Это длительное время затрудняло установление конфигурации сфингозиновых оснований цереброзидов, так как при кислотном гидролизе последних выделяли смесь *трео*- и *эритро*-форм 4-сфингенина.

Синтез сфингозиновых оснований

С химической точки зрения можно выделить по крайней мере три общих подхода к синтезу аминодиолов природного строения [225]: а) синтез с использованием нитроэтанольной конденсации; б) синтез через производные β -оксо- α -аминокислот; в) создание аминоспиртовой группировки путем размыкания эпоксидов.

Синтез с использованием нитроэтанольной конденсации. В химии сфингозиновых оснований широко используется конденсация альдегидов с нитроэтанолом, приводящая к 2-нитро-1,3-диолам, которые затем могут быть превращены в 2-амино-1,3-диолы восстановлением:

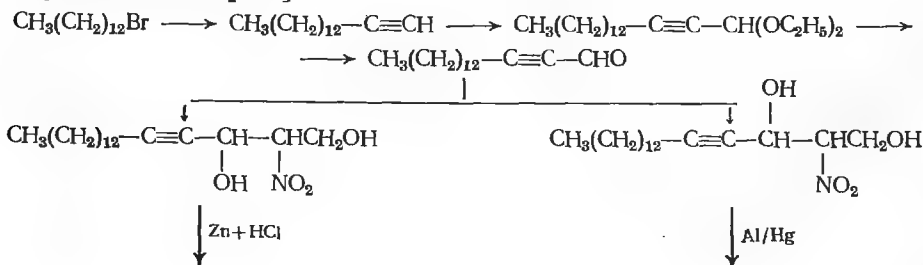


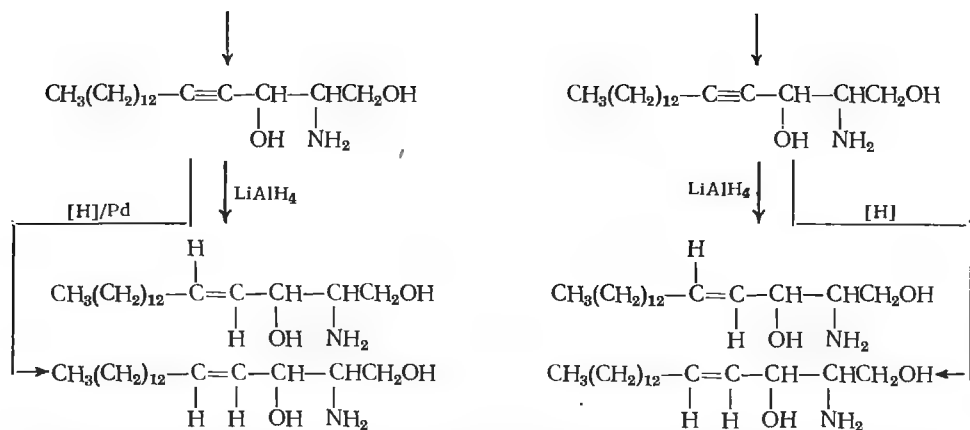
Впервые она была предложена для синтеза сфинганина ($\text{R}=\text{C}_{15}\text{H}_{31}$) [226], а затем ее использовали для синтеза 4-сфингенина ($\text{R}=\text{CH}=\text{CHC}_{13}\text{H}_{27}$) [227] и его гомологов [228], эйкозасфинганина ($\text{R}=\text{C}_{17}\text{H}_{35}$) [229], 4-эйкозасфингенина ($\text{R}=\text{CH}=\text{CHC}_{15}\text{H}_{31}$) и 4-метоксисфинганина ($\text{R}=\text{CH}(\text{OCH}_3)\text{C}_{14}\text{H}_{29}$).

Наиболее серьезным затруднением при работе по данной схеме является то, что реакция не стереоспецифична и приводит к смеси *трео*- и *эритро*-изомеров, причем именно *трео*-изомер — изомер с неприродной конфигурацией — образуется в несколько больших количествах и легче выделяется перекристаллизацией. В связи с этим в последнее время этот метод был использован для получения *трео*-производных 4-сфингенина, представляющих интерес в качестве антиметаболитов [230].

Другой проблемой является доступность исходных альдегидов жирного ряда. При синтезе 4-сфингенина [227] и 4-эйкозасфингенина по данной схеме для получения альдегидов использовали малодоступные алкилгалогениды с нечетным числом углеродных атомов, что существенно усложняет на первый взгляд такой простой подход к синтезу сфингозиновых оснований.

Синтез изомерных *рас*-4-сфингенинов этим методом осуществляют по следующей схеме [227]:

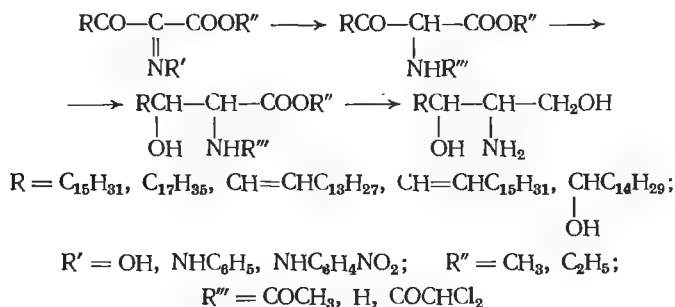




При взаимодействии тридецилбромида с ацетиленом натрия образуется пентадецин-1, который после присоединения ортомуравьиного эфира и гидролиза превращается в гексадецин-2-аль-1. Конденсация этого альдегида с нитроэтанолом в присутствии карбоната натрия дает смесь *трео*- и *эритро*-изомеров, которую разделяют кристаллизацией. Восстановление *эритро*-изомера сначала цинком в соляной кислоте, а затем литийалюминийгидридом или на катализаторе Линдлара дает два изомерных (*цис*- и *транс*-) *гас*-4-сфингенина. Аналогично из *трео*-изомера, применяя амальгаму алюминия и LiAlH_4 или каталитическое гидрирование, получают *цис*- и *транс-трео*-изомеры 4-сфингенина.

В настоящее время разработаны методы превращения *трео*-изомера нитродиола [227] или полученного из него *трео*-4-сфингенина [231] в *эритро*-изомер.

Синтез через производные α -амино- β -оксокислот. В качестве исходных соединений были использованы оксимы ($\text{R}'=\text{OH}$) или фенилгидразоны ($\text{R}'=\text{NHC}_6\text{H}_5$) 2,3-диоксокарбоновых кислот, ступенчатое восстановление которых приводит к смеси соответствующих *трео*- и *эритро*-изомеров:

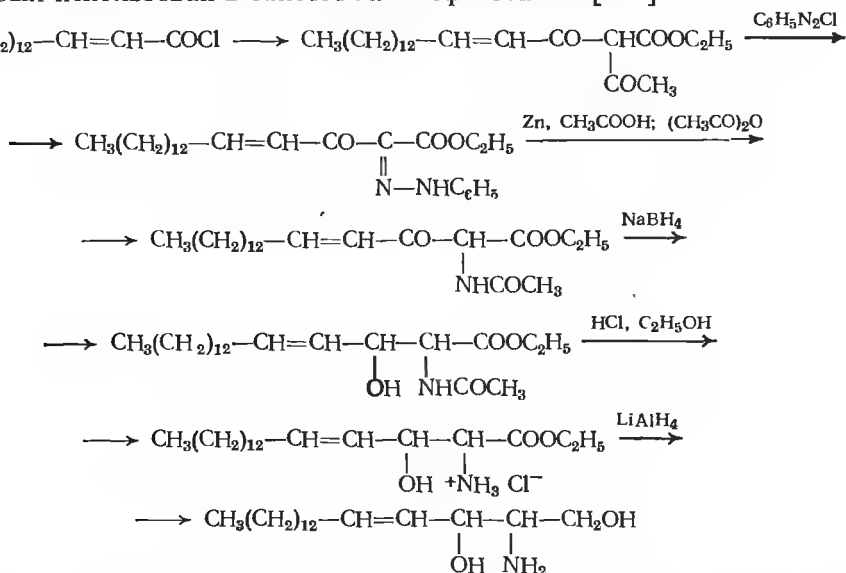


Наиболее удачным вариантом этой схемы являются ацилирование ацетоуксусного эфира и последующая реакция Яппа — Клингемана для получения исходного гидразона ($\text{R}'=\text{NHC}_6\text{H}_5$; $\text{R}''=\text{C}_2\text{H}_5$) [232—234]. Таким путем были синтезированы сфинганин [234], 4-сфингенин [233], эйкозасфинганин [235], 4-эйкозасфингенин [236] и 4-оксисфинганин [237].

Соотношение образующихся *трео*- и *эритро*-изомеров зависит от метода восстановления оксогруппы в положении 3 и от того, на какой

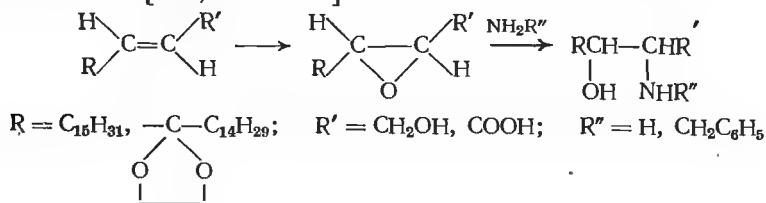
стадии синтеза осуществляют это превращение. Следует отметить, что образовавшиеся *трео*- и *эритро*-2-амино-3-оксипроизводные могут быть разделены в виде дихлорацетиламино- или ацетиламиносоединений, причем *эритро*-изомер менее растворим и выделяется легче.

Если восстановление проводить боргидридом натрия на стадии этилового эфира 2-ацетиламино-3-оксокислоты, то оно идет по правилу Крама с преимущественным образованием *эритро*-изомера [238]. Этот прием был использован в синтезе *rac*-4-сфингенина [233]:

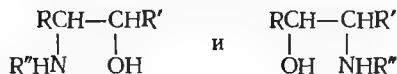


Первой стадией при синтезе 4-сфингенина является конденсация гексадецеонилхлорида с натрийацетоуксусным эфиром с образованием продукта С-ацилирования. Полученный далее по реакции Яппа — Клингемана с хлористым фенилдиазонием фенилгидразон подвергают восстановительному ацилированию цинком в уксусной кислоте в присутствии уксусного ангидрида до ацетамидоэфира, селективное восстановление оксогруппы которого натрийборгидридом приводит к смеси эфиров *трео*- и *эритро*- α -ацетиламино- β -оксикислот. *эритро*-Изомер выделяют селективной кристаллизацией. Гидролиз амида и последующее восстановление литийалюмогидридом позволяют получить *rac*-4-сфингенин с выходом 7% (на исходное соединение).

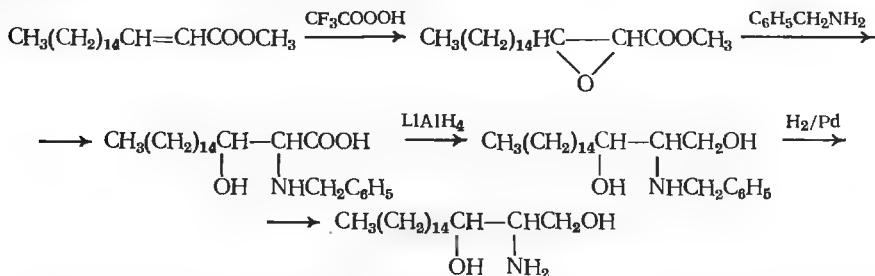
Создание аминоспиртовой группировки путем размыкания эпоксидов. Хорошо известно, что эпоксиды могут быть стереонаправленно превращены в аминоспирты нужной конфигурации. Так, под действием аминов или аммиака *транс*-эпоксиды превращаются в *эритро*-, а *цис*-эпоксиды — в *трео*-аминоспирты. Это нашло применение в синтезе сфингозиновых оснований [220, 239—242]:



Однако оказалось, что кроме *трео*- и *эритро*-изомеров образуются изомеры положения



причем их соотношение, т. е. избирательность направления атаки амина ($R''NH_2$) при раскрытии эпоксидного кольца, сильно зависит от природы заместителей R и R' и от строения атакующего амина. Так, при синтезе сфинганина действием аммиака на *транс*-эпоксид ($R=C_{15}H_{31}$; $R'=CH_2OH$) получили оба возможных изомера положения в соотношении 1:1 [220, 239], а при реакции бензиламина с 2,3-*транс*-эпоксистеариновой кислотой ($R=C_{15}H_{31}$; $R'=COOH$) образуется преимущественно 2-бензиламино-3-оксизомер, а выход 3-бензиламино-2-оксисоединения не превышает 10% [240—242]:

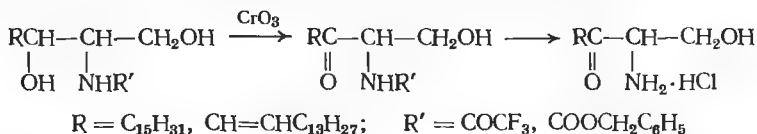


Таким образом, данный стереоспецифический путь синтеза сфингозиновых оснований может быть весьма строго направленным. Однако синтез ненасыщенных аминодиолов этим способом пока осуществить не удалось.

В синтезе сфинганина известное значение в последнее время начала приобретать реакция Дэкина — Веста [243], а для получения алифатических аминотриолов природной конфигурации — использование в качестве исходного сырья 4-сфингенина или углеводов известной конфигурации [244].

Синтез 3-дегидросфинганина. В связи с изучением биосинтеза сфингозиновых оснований (см. стр. 364) возник интерес к синтезу 3-дегидросфинганина, особенно его меченого аналога [245].

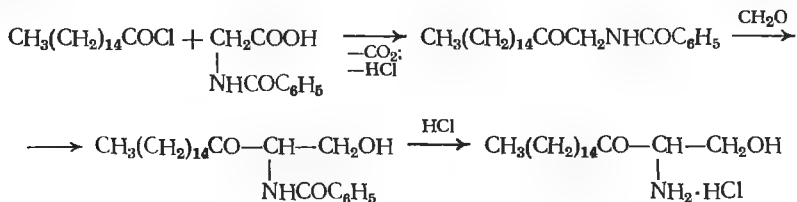
В настоящее время 3-дегидросфинганин (2-амино-3-оксо-1-оксоиктадекан) удалось получить в виде его гидрохлорида путем окисления N-защитенного сфинганина (N-трифторацетил-, N-карбобензоксикс-) хромовым ангидридом в пиридине с последующим снятием защиты в кислой среде или каталитическим гидрированием:



3-Дегидросфинганин в виде свободного основания неустойчив, что является общим свойством оксоаминов. Избирательность окисления вторичной гидроксильной группы в жестких условиях (CrO_3) невелика, выходы 3-кетопроизводного не превышают 40%.

Гораздо более перспективным является полный синтез *rac*-3-дегидросфинганина из гиппуровой кислоты и пальмитоилхлорида с использованием реакции Дэкина — Веста [246]. Образующийся на первой стадии 1-*N*-бензоиламино-2-оксогептадекан оксимети-

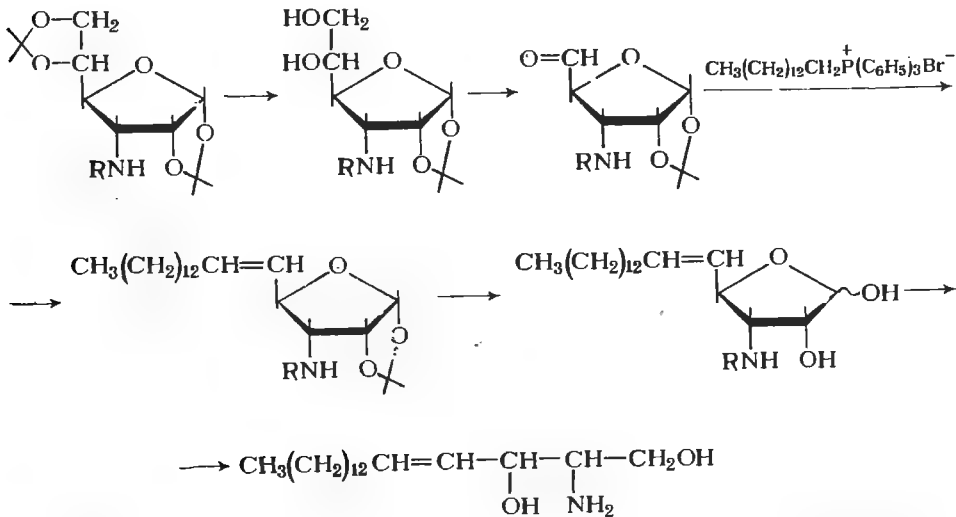
лируют и после снятия бензоильной защиты выделяют *гас-3*-дегидросфинганин в виде гидрохлорида:



Расщепление рацемических оснований на антиподы

Синтез сфингозиновых оснований приводит, как правило, к рацемическим соединениям. Для получения сфингозиновых оснований *D*-ряда необходимо расщепление рацемата на антиподы, что является сложной и трудоемкой задачей. Будучи слабыми аминами, они не дают устойчивых хорошо кристаллизующихся солей с обычными кислотными расщепляющими агентами. Чаще всего для этой цели применяют *D*- и *L*-глутаминовые кислоты [229, 233, 242, 246а, 247]. Однако оказалось, что соли оснований с миндальной кислотой лучше растворимы и более четко кристаллизуются, чем глутаматы. Миндальная кислота была использована для расщепления *rac*-сфинганина и *rac*-*трео*-сфинганина [245]. Расщепление 3-*O*-бензоил-*rac*-сфинганина и 3-*O*-бензоил-*rac*-4-сфинганина было проведено при помощи *D*-винной кислоты [224, 248, 249].

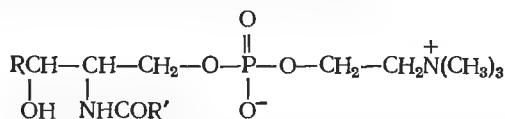
Естественно, были предприняты попытки найти исходные вещества, из которых могут быть сразу приготовлены природные *D-эритро*-изомеры оснований. Этими веществами явились углеводы. Подобная идея была использована в синтезе фитосфингозина (4-оксисфинганина), исходя из *D*-глюкозамина [244], а также в синтезе сфинганина и 4-сфинганина из 3-амино-3-дезоксис-1,2,5,6-ди-*O*-изопропилиден- α -*D*-аллофуранозы с использованием реакции Виттига:



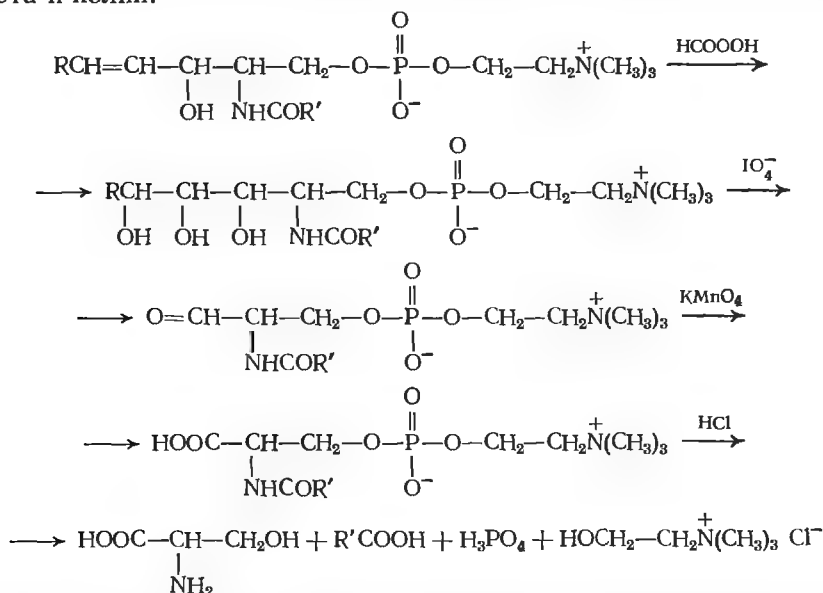
Следует отметить, что в препаративном отношении этот метод серьезно уступает всем предыдущим.

Фосфорсодержащие сфинголипиды

К фосфорсодержащим сфинголипидам относят производные церамидов, у которых водород первичной гидроксильной группы замещен на остаток фосфорной или фосфоновой кислот. Наиболее широко распространены сфингомиелины — церамидфосфорилхолины:



Сфингомиелины. Для установления строения сфингомиелина использовано гидроксилирование двойной связи основания надмуравьиной кислотой и периодатное окисление полученного при этом соединения. Образовавшийся амидоальдегид, содержащий фосфорилхолиновую группировку, далее окисляли перманганатом и гидролизовали. В результате этих превращений были получены серин, жирная кислота, фосфорная кислота и холин:



Такой способ — последовательное окисление и гидролиз — в настоящее время стал традиционным при установлении строения фосфорсодержащих сфинголипидов.

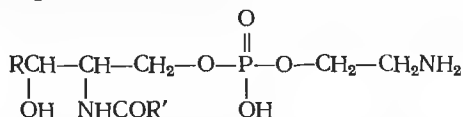
От глицерофосфолипидов сфингомиелины отличаются устойчивостью к щелочному и кислому гидролизу в мягких условиях; на этом основано их отделение от таких липидов. При действии 2 н. HCl при 125 °C в течение 46 ч или 3 н HCl при 75 °C в течение 24 ч сфингомиелин гидролизуется полностью, давая смесь жирной кислоты, сфингозинового основания, холина и фосфорной кислоты.

Основным представителем сфингозиновых оснований в сфингомиелинах является сфингозин C₁₈ (4-сфингенин), которому всегда сопутствует небольшое количество (до 10%) сфинганина. Кроме того, сфингомиели-

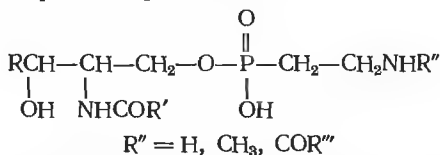
новые фракции содержат 4-гексадекасфингенин (плазма крови), 4-оксисфинганин (почки), 4-эйкозасфингенин и эйкозасфинганин (мозг). В сфингомиелинах плазмы крови в небольших количествах обнаружено необычное диеновое основание — 4,14-сфингадиенин.

При изучении жирнокислотного состава сфингомиелинов было показано, что в их состав входят лишь насыщенные и моноеновые кислоты (пальмитиновая, стеариновая, лигноцериновая, нервоновая и др.). Это существенно отличает данный вид сфинголипидов от гликоcsфинголипидов, которые содержат значительные количества оксикислот.

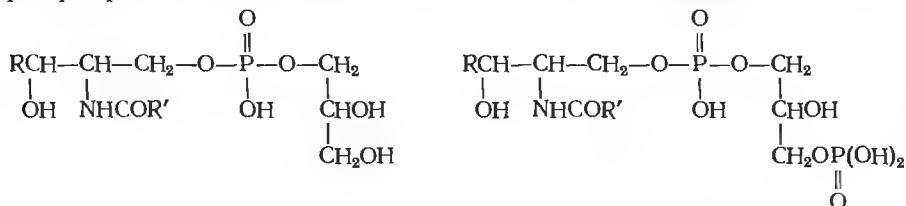
Сфингомиелины являются важным компонентом фосфолипидных мембран животных тканей. Они встречаются в печени, почках, легких, селезенке, в крови и, главным образом, в нервной ткани. В больших количествах сфингомиелины содержатся в сером и белом веществах мозга и оболочках аксонов периферической нервной системы в составе так называемого миелина (см. стр. 374). Было установлено, что сфингомиелины в отличие от глицерофосфолипидов не являются универсальным компонентом нервных клеток и появляются в составе нервной ткани лишь на определенной ступени эволюции нервной системы. Их значительно больше у высших позвоночных: млекопитающих, птиц, рептилий (10—12% от суммы липидов) и гораздо меньше у низших позвоночных (карп — 1—2%, амфибия — 3—4%), в центральной нервной системе дождевого червя и брюхоногих моллюсков они отсутствуют. У низших представителей животного мира (мухи, муравьи, пресноводные, мидии) роль сфингомиелина в нервной ткани, возможно, выполняет его этанол-аминный аналог — сфингоэтаноламин:



В липидах беспозвоночных наряду со сфингозаноламином обнаружены сфинголипиды, дающие при гидролизе производные фосфоновой кислоты — аминоэтилфосфонилцерамиды:


$$R'' = H, CH_3, COR'''$$

У некоторых моллюсков нашли N-метиламиноэтилфосфонилцерамид и его N-ацилпроизводное. У анаэробных бактерий наряду со сфингоэтанололамином найдены церамидфосфорилглицерин и церамидфосфорилглицеринфосфат:



Аналогичные изменения в содержании сфингомиелинов происходят в процессе развития организма. Сфингомиелин появляется как в мозге в

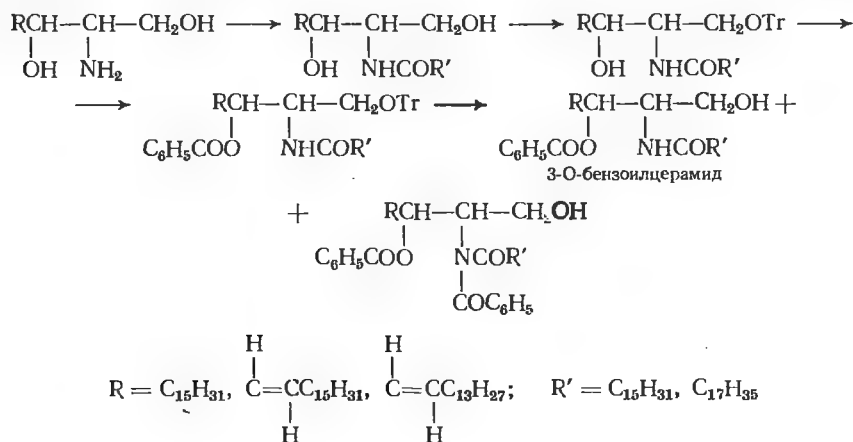
целом, так и в миелине, где его больше всего, лишь к началу процесса миелинизации, а затем его количество начинает быстро расти.

При сопоставлении данных возрастных изменений жирнокислотного состава сфингомиелинов мозга обнаружена интересная закономерность. Перед миелинизацией в сфингомиелинах белого и серого веществ головного мозга преобладает стеариновая кислота. В ходе миелинизации ее доля уменьшается за счет увеличения количества кислот C_{22} — C_{26} , особенно нервоной. При изучении структуры миелина с помощью рентгеноструктурного анализа было высказано предположение, что устойчивость миелиновой мембраны в значительной степени зависит от наличия в сфинголипидах насыщенных или мононенасыщенных цепей максимальной длины.

Содержание сфингомиелинов в плазме крови довольно высоко (8—15% от общего содержания липидов). В плазме содержатся молекулы сфингомиелинов, в состав которых входят в основном пальмитиновая кислота (до 64%) и сфингозиновые основания очень пестрого состава, в том числе с нечетным числом атомов углерода в цепи (от C_{14} до C_{19}). Из структурных элементов крови наиболее подробно были изучены эритроциты. Было установлено, что содержание сфингомиелинов в эритроцитах велико (до 30—40% от общего количества липидов), здесь они являются почти единственными представителями сфинголипидов. Интересно, что иногда в эритроцитах практически отсутствует лецитин. Недавно установлено, что между сфингомиелинами плазмы и эритроцитов существует обмен, в котором участвует до 75% сфингомиелинов эритроцитов.

Индивидуальные сфинголипиды природной структуры, а также их пространственные изомеры и различные меченые производные, необходимые для детального изучения биологической роли сфинголипидов, в достаточных количествах могут быть получены синтетическим путем.

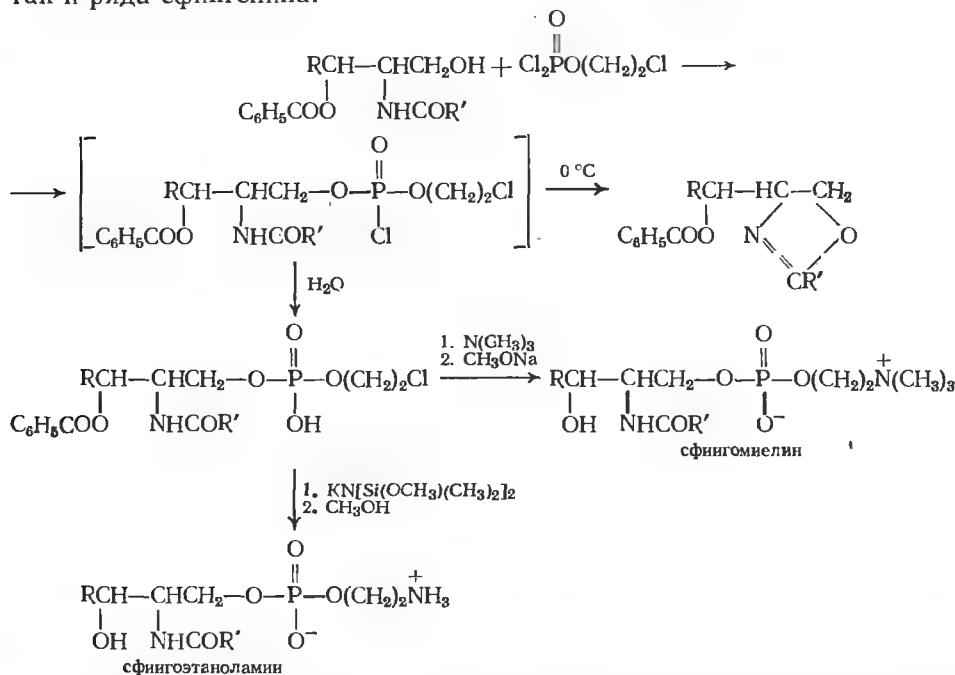
Важным моментом в синтезе сфинголипидов является получение производных церамидов — N-ацилированных сфингозиновых оснований. Классическим соединением такого рода стал 3-O-бензоилцерамид [224, 251, 252]:



В последнее время разработан способ введения тритильной и бензильной групп последовательно, без выделения, в одном и том же растворителе, а затем тритильная защита удаляется в кислой среде [253]. Благодаря надежному хроматографическому методу контроля удастся провести синтез направленно и избежать образования значительных количеств побочного N-ацил-N-бензоилпроизводного [254].

3-О-Бензоилцерамид, как и все амидоспирты, в присутствии хлорангидридов кислот образует производные оксазолинов, поэтому при его фосфорилировании возможно образование подобных соединений.

Для синтеза сфингофосфолипидов в качестве фосфорилирующего агента часто используют β -хлор(бром)этилфосфорилдихлорид [255—261]. В оптимальных температурных условиях ($-10 \div -15^\circ\text{C}$) выход составляет около 80% [262]; в этих условиях практически не происходит замыкания оксазолинового цикла. После проведения фосфорилирования далее можно перейти как к сфингомиелинам, так и к сфингоэтаноламину. Сфингомиелин получают нагреванием фосфата с триметиламином. В синтезе сфингоэтаноламина для замены галогена на аминогруппу используют бис(диметилметоксисилил)амид калия [263] или бензиламин [260]. Этими методами были получены как производные дигидроряда, так и ряда сфингенина:



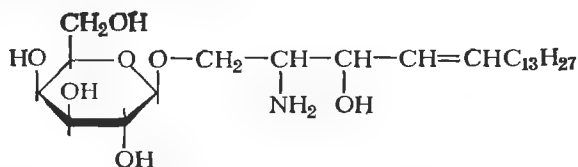
Сфингофосфолипиды — кристаллические бесцветные вещества, плавящиеся в интервале $170\text{--}220^\circ\text{C}$. В ИК-спектрах сфингофосфолипидов присутствуют полосы поглощения, характерные для амидной группировки (1640 и 1540 см^{-1}), *транс*-двойной связи (980 см^{-1}) и фосфатной группы ($1200\text{--}1050\text{ см}^{-1}$). Природные сфингофосфолипиды *D*-эритро-конфигурации, а также синтетические оптически деятельные образцы, полученные на базе *D*-эритро-оснований, обладают положительными значениями удельного вращения $[\alpha]_D$.

Гликофинголипиды

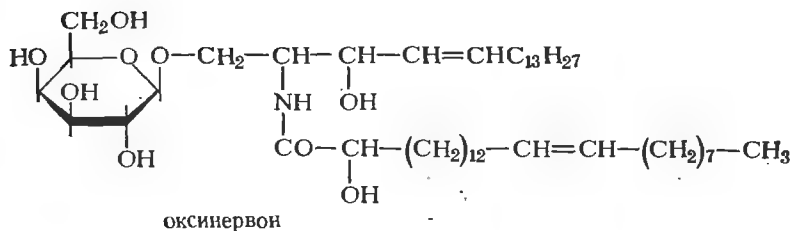
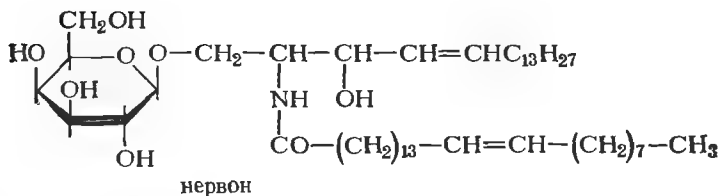
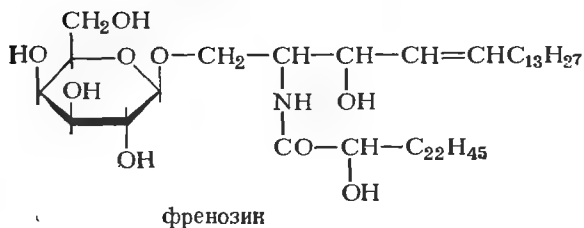
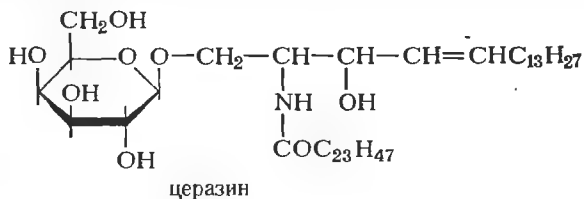
Гликофинголипиды — это сложные липиды, липофильная часть молекулы которых — церамид, соединена β -гликозидной связью с полярным углеводным остатком [264]. Они встречаются в составе наружных мембран клетки, а также в крови и чрезвычайно важны в явлениях межклеточной адгезии, обладают иммунологическими свойствами, а также играют важную роль в таких явлениях, как злокачественный рост клеток.

Среди гликосфинголипидов различают несколько классов соединений: цереброзиды, сульфатиды, церамидолигогексозиды, глобозиды, гематозиды, ганглиозиды.

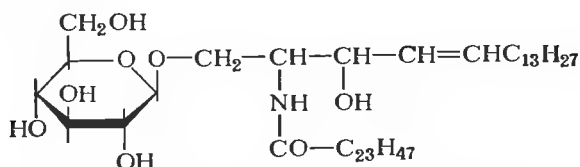
Цереброзиды. Эта группа липидов впервые была обнаружена в составе мозга, в связи с чем и получила свое название. Цереброзиды не содержат фосфорной кислоты и при гидролизе дают сфингозиновое основание, жирную кислоту и гексозу (галактозу, реже глюкозу) в соотношении 1 : 1 : 1. При частичном гидролизе цереброзидов был получен психозин — 4-сфингенилгалактозид:



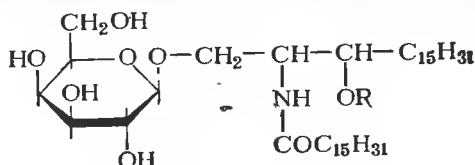
Установлено, что цереброзиды являются 1-O-(β -D-галактопиранозил)-2-N-ацил-4-сфингенинами. Наиболее изученными представителями цереброзидов являются выделенные из мозга церазин, френозин, нервон и оксинервон, содержащие соответственно лигноцериновую, цереброновую, нервовую и оксинервовую кислоты:



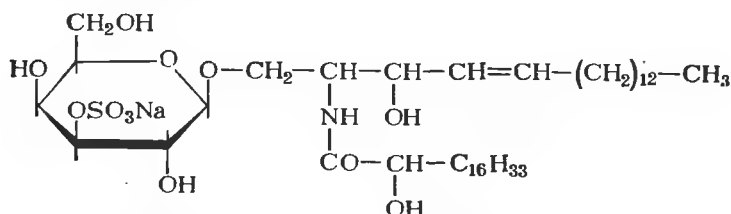
Из селезенки был выделен глюкоцереброзид, содержащий вместо галактозы глюкозу:



Среди минорных компонентов цереброзидов мозга обнаружены цереброзиды, содержащие сфинганин, замещенный в положении 3 [265]:

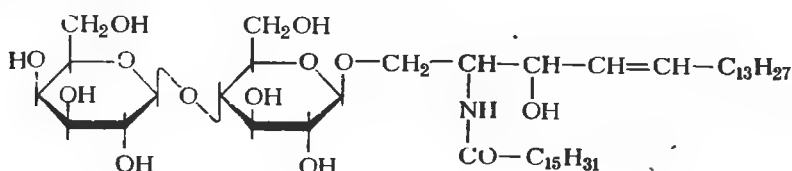


Сульфатиды. В отличие от цереброзидов, которые являются нейтральными гликолипидами, сульфатиды обладают ярко выраженным кислым характером. При их гидролизе кроме сфингозинового основания, жирной кислоты и гексозы образуется также серная кислота. Установлено, что сульфатиды — сульфаты цереброзидов — содержат остаток серной кислоты в положении 3 остатка галактозы, например:



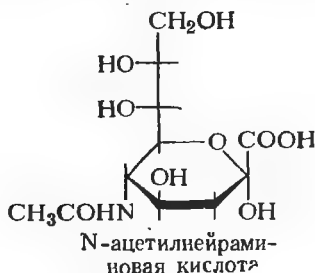
Из-за наличия сильной кислотной группировки сульфатиды легко образуют соли. В последнее время считают, что этим солям должна принадлежать важная роль в процессе ионного транспорта через мембраны.

Церамидолигогексозиды — гликосфинголипиды, углеводная часть молекулы которых является олигосахаридом, содержащим 2, 3 и более остатков нейтральных гликопираноз. Наиболее изученным соединением такого рода является цитолипин Н, который был выделен из эпидермоидной карциномы человека и представляет собой смесь β-лактозидов различных церамидов:



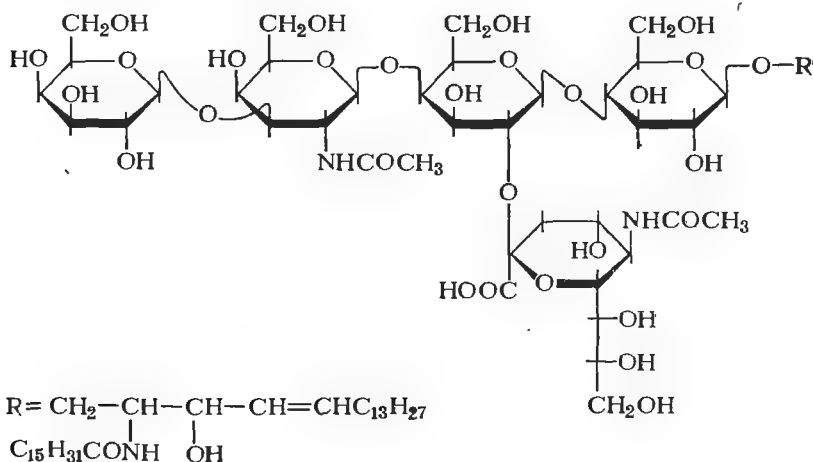
Глобозиды содержат в углеводной части молекулы олигосахарид, в состав которого наряду с нейтральными моносахаридами входит аминоксахар. Например, в эритроцитах человека присутствует N-ацетилгалактозаминил-(1 → 6)-галактозил-(1 → 4)-галактозил-(1 → 4)-глюкозил-(1 → 1)-N-лигноцерил-4-сфингенин.

Гематозиды наряду с гексозами в углеводной части молекул содержат по крайней мере 1 моль сиаловой (нейраминовой) кислоты:



Их выделяют из эритроцитов и из мозга.

Ганглиозиды — наиболее сложные гликосфинголипиды, в углеводной части молекулы которых содержатся гликопиранозы, аминоксахара и сиаловая кислота. В наибольшем количестве такие гликосфинголипиды находятся в коре головного мозга. Они существенно различаются между собой по составу и строению. Все ганглиозиды содержат, как правило, стеариновую кислоту, однако сфингозиновое основание может варьироваться. Для ганглиозидов коры головного мозга характерно наличие длинноцепных оснований состава C_{20} — 4-эйкозасфингенина и эйкозасфинганина, а также сфинганина и 4-сфингенина. Ганглиозиды могут содержать 1, 2, 3 и более остатков нейраминовой (сиаловой) кислоты, различают моносиало- (G_M), дисиало- (G_D), трисиалоганглиозиды (G_T) и т. д. В качестве примера можно привести формулу моносиалоганглиозида, выделенного из мозга:



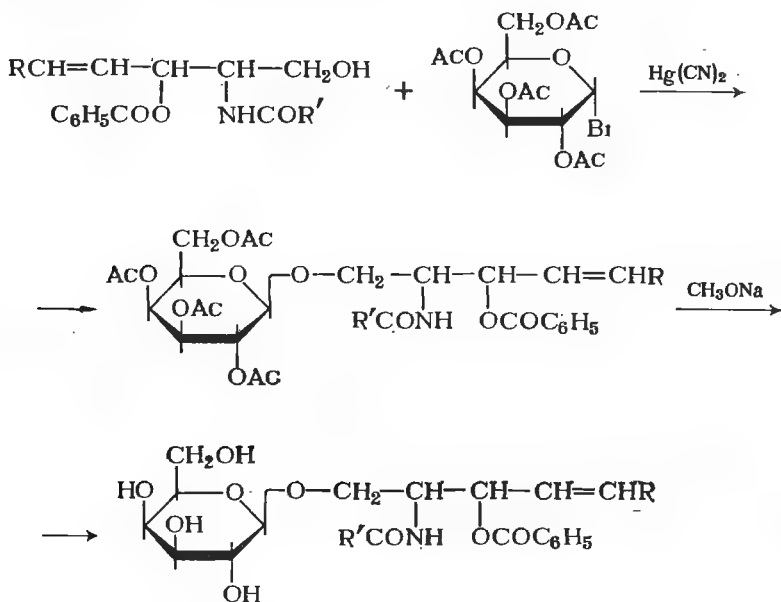
Молекулярная масса ганглиозидов колеблется в пределах 1500—3000.

При установлении структуры ганглиозидов использованы приемы, типичные для химии гетерополисахаридов: периодатное окисление, мети-

лирование с последующим гидролизом, гидролиз специфическими нейрамидазами.

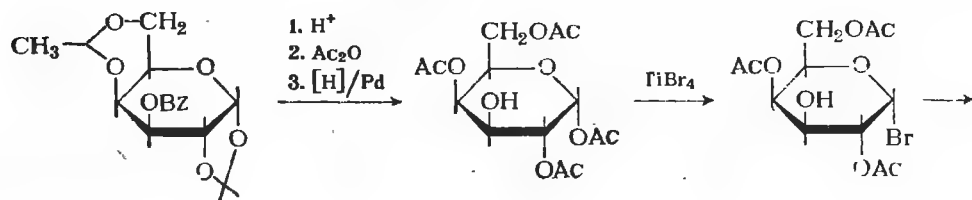
Важным моментом при изучении гликофинголипидов является синтез отдельных представителей этого класса соединений или их фрагментов.

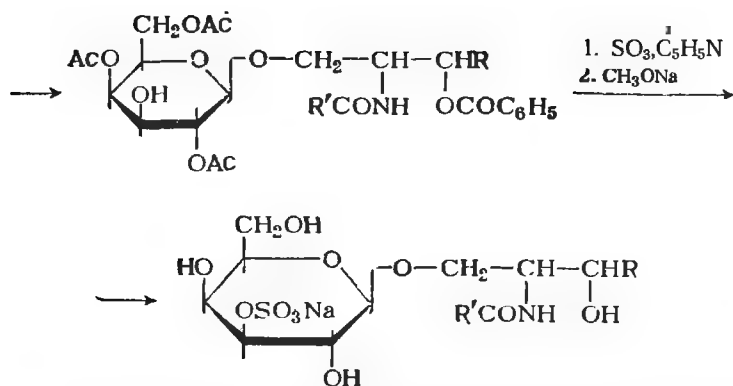
Синтез ряда цереброзидов был осуществлен [248] путем конденсации 3-О-бензоилцерамида с 2,3,4,6-тетра-О-ацетил- α -D-галактозилбромидом в присутствии цианида ртути и последующего снятия ацильных защит метилатом натрия по методу Земплена:



Цианид ртути, по-видимому, является специфическим катализатором гликозилирования в ряду гликофинголипидов [225]. При использовании обычных катализаторов реакции Кенигса—Кнорра (карбонат серебра или окись серебра) во всех случаях выделяемые вещества были смесью α - и β -аномеров [224, 266].

Осуществлен также синтез 3-О-сульфата дигидrocереброзида. С этой целью 4,6-О-этилиден-1,2-О-изопропилиден- α -D-галактоза была превращена в бензиловый эфир, затем удалили ацетальные защиты и после исчерпывающего ацетилирования сняли бензильную защиту гидрогенолизом. Полученный на следующей стадии неустойчивый бромид без выделения ввели в конденсацию с 3-О-бензоилцерамидом в присутствии цианида ртути. Обработка образовавшегося защищенного цереброзида SO_3 в пиридине дала 3-сульфат цереброзида:





Аналогичным методом был получен 6-О-сульфат цереброзида.

Кроме того, синтезированы психозин [252] и 1-О-лактозил-4-сфингенин [267] — продукты частичного гидролиза цереброзидов и цитолипина Н. Оба соединения содержат свободную неацелированную аминогруппу. В ходе синтеза для ее защиты была использована дихлорацетильная группировка, удаляемая гидролизом в присутствии $\text{Ba}(\text{OH})_2$. Получен также 3-О-алкилцереброзид [268]. Осуществлен синтез фрагментов полисахаридной части молекулы ганглиозидов [269]. Однако более сложные гликосфинголипиды, особенно ганглиозиды, пока синтетически не получены.

БИОСИНТЕЗ И КАТАБОЛИЗМ ЛИПИДОВ

БИОСИНТЕЗ ВЫСШИХ ЖИРНЫХ КИСЛОТ

В организмах различного происхождения обнаружены ферментные системы, осуществляющие полный синтез высших жирных кислот с помощью многократно повторяющейся конденсации двууглеродных фрагментов (синтез *de novo*). Подобный путь биосинтеза жирных кислот наблюдается в цитоплазме (немитохондриальные системы) и в митохондриях. Немитохондриальная ферментная система значительно более активна, и она в основном и ответственна за биосинтез *de novo* высших жирных кислот. Кроме того, в митохондриях и микросомальных фракциях обнаружены ферментные системы удлинения цепи жирных кислот.

Биосинтез *de novo* жирных кислот. Биосинтез насыщенных жирных кислот в большей степени изучен в бактериальных организмах, например *E. Coli*; полагают, что в растительных и животных организмах общие принципы биосинтеза жирных кислот аналогичны [270].

Основным строительным блоком для синтеза высших жирных кислот служит ацетил-S-КоА, который образуется в митохондриях в результате β-окисления высших жирных кислот, а также при окислительном декарбоксилировании пирувата, возникающего из глюкозы в процессе гликолиза. Как указывалось, основным участком биосинтеза высших жирных кислот является цитоплазма, куда и должен поступать ацетил-S-КоА. Однако митохондриальная мембрана непроницаема для ацетил-S-КоА, в связи с чем он должен подвергаться различным преобразованиям в транспортабельную форму, в которой может диффундировать через митохондриальную мембрану. Для этого в распоряжении клетки, по-видимому, имеется несколько возможностей, причем трудно сказать, какая из

них реализуется в большей степени. Возможные механизмы, обеспечивающие перенос ацетильной группы через митохондриальную мембрану, приведены ниже:

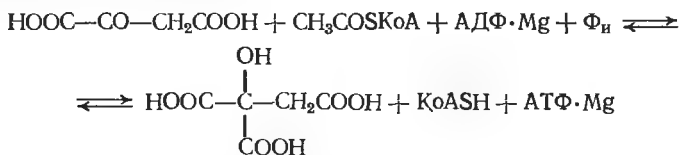


По одному механизму ацетил-S-КоА переводится в ацетат с участием фермента ацетил-КоА-синтетазы:



Ацетат диффундирует в цитоплазму, где вновь превращается в ацетил-S-КоА.

Другая возможность для проникновения митохондриального ацетил-S-КоА в цитоплазму состоит в том, что он реагирует с оксалоацетатом с образованием цитрата:



Цитрат далее транспортируется через митохондриальную мембрану в цитоплазму, где под действием фермента цитрат-синтетазы превращается в ацетил-S-КоА и оксалоацетат, который снова включается в образование цитрата в митохондриях. Полагают, что данный процесс обеспечивает перенос основного количества ацетил-S-КоА в цитоплазму, где он является субстратом для биосинтеза жирных кислот.

Кроме того, возможен перенос ацетильного остатка через митохондриальную мембрану с участием карнитина в виде ацетилкарнитина.

Первым специфическим промежуточным продуктом биосинтеза жирных кислот является малонил-S-КоА, который возникает в результате карбоксилирования ацетил-S-КоА в присутствии АТФ и фермента аце-

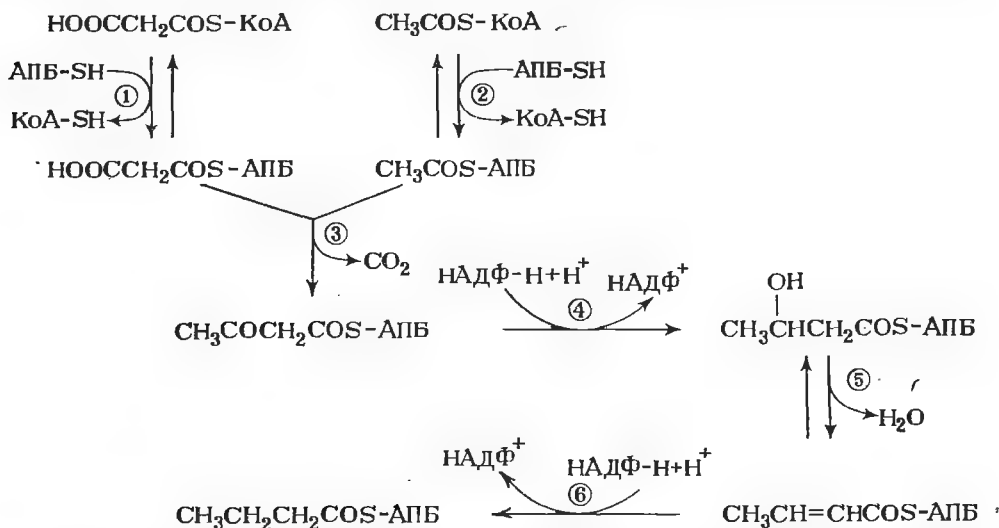
тил-КоА-карбоксилазы (6.4.1.2), содержащей в качестве простетической группы биотин:



В биосинтезе высших жирных кислот бактериальных организмов (например, *E. Coli*) участвует также так называемый ацилпереносящий белок (АПБ), который содержит сульфгидрильную группу и присоединяет все промежуточные ацилпроизводные путем образования тиоэфирной связи. Этот белок содержит в качестве простетической группы 4-фосфопантотеиновую кислоту, связанную ковалентно с ОН-группой серина с помощью фосфодиэфирной связи [271]. Аналогичный белок включается в биосинтез жирных кислот в растениях и животных.

Ферментные системы, участвующие в биосинтезе жирных кислот, значительно отличаются у разных организмов. Так, синтетаза жирных кислот дрожжей представляет собой мультифермент с молекулярной массой 2 300 000 и ведет себя как отдельный компонент, обладающий всеми видами необходимой ферментативной активности. Ферментная система *E. Coli* состоит из нескольких компонентов.

Биосинтез жирных кислот осуществляется с помощью многократно повторяющегося цикла, включающего шесть последовательных реакций:

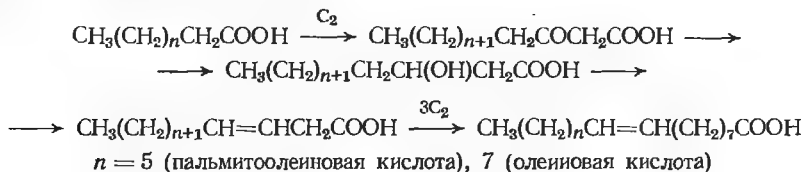


В реакции 1 малонилтрансацилаза катализирует перенос остатка малоновой кислоты от малонил-S-КоА к ацилпереносящему белку, давая малонил-S-АПБ и КоА. В реакции 2 ацетилтрансацилаза катализирует аналогичный перенос ацетильной группы от ацетил-S-КоА к ацилпереносящему белку, образуя ацетил-S-АПБ и КоА. Следующая ступень (3) включает конденсацию малонил-S-АПБ и ацетил-S-АПБ, которая сопровождается декарбоксилированием и образованием ацетоацетил-S-АПБ. Реакция катализируется β -кетоацил-АПБ-синтетазой и почти необратима. При проведении исследований с $^{14}\text{CO}_2$ было показано, что он не включается в жирную кислоту, т. е. CO_2 выделяется в том же количестве, в каком расходуется при карбоксилировании ацетил-S-КоА.

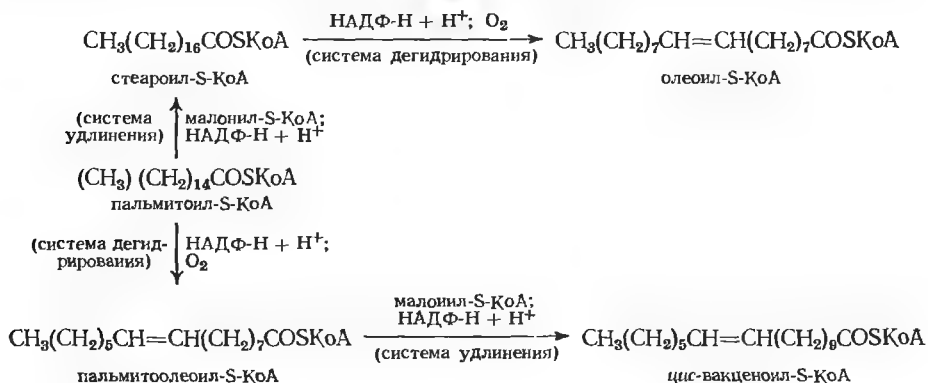
Далее (реакция 4) осуществляется восстановление ацетоацетил-S-АПБ в D-(-)- β -оксibuтирил-S-АПБ при участии восстановленной

Синтез ненасыщенных кислот в бактериальных организмах осуществляется по двум механизмам. В аэробных условиях ненасыщенные кислоты образуются путем окислительного дегидрирования насыщенных кислот в присутствии O_2 и восстановленной формы НАДФ. Субстратами реакции служат ацил-S-КоА или ацил-S-АПБ. Ферментные системы, катализирующие подобные процессы, сосредоточены в основном в мембранах микросом. Так, из пальмитиновой и стеариновой кислот через неидентифицированные промежуточные соединения образуются соответственно пальмитоолеиновая и олеиновая кислоты.

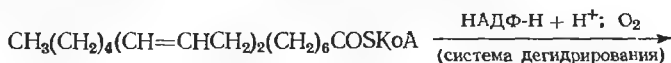
В анаэробных условиях биосинтез ненасыщенных кислот реализуется по другому механизму: путем введения двойных связей в жирную кислоту в процессе удлинения цепи с помощью двууглеродного фрагмента (C_2). Полагают, что в этом случае β -оксиацил-S-КоА дегидратируется с образованием β,γ -ненасыщенных производных КоА, причем далее двойная связь не восстанавливается, а в процессе роста цепи «отодвигается» от карбоксильного конца:

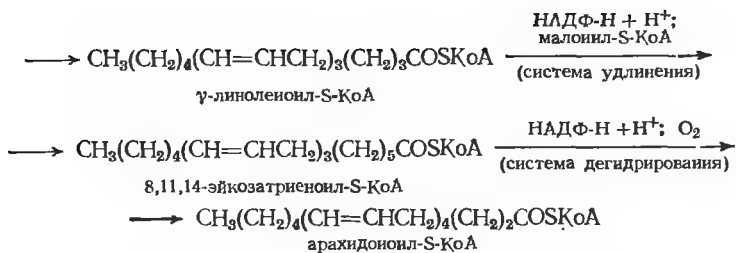


В животном организме биосинтез ненасыщенных жирных кислот осуществляется с помощью реакций дегидрирования и удлинения цепи [272], причем у высших животных синтезируются лишь моноеновые кислоты, например олеиновая и ее структурные изомеры. Так, из пальмитиновой кислоты в зависимости от последовательности процессов дегидрирования и удлинения цепи могут образоваться олеиновая или пальмитоолеиновая кислоты, а из последней далее — *цис*-вакценовая:



Линолевая и линоленовая кислоты в животном организме не синтезируются, а поступают с пищей и включаются в систему дегидрирования и удлинения цепи, в результате чего образуются кислоты различной длины цепи и степени ненасыщенности, отличающиеся положением двойных связей. Например, биосинтез арахидоновой кислоты на основе линолевой кислоты можно представить следующим образом:





Аналогично линоленовая кислота превращается в клетке в полиеновые кислоты состава $\text{C}_{20}:5$ и $\text{C}_{22}:6$ и т. д.

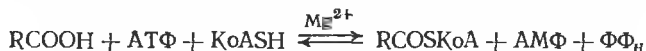
Высшие растения синтезируют олеиновую, линолевую и линоленовую кислоты.

КАТАБОЛИЗМ ЖИРНЫХ КИСЛОТ

Катаболизм жирных кислот связан с их окислительным расщеплением, которое представляет собой универсальный биохимический процесс, свойственный всем организмам. В клетке окисление жирных кислот локализовано в митохондриях. β -Окисление высших жирных кислот является одним из важнейших энергетических процессов организма, что и определяет физиологическое значение катаболизма жирных кислот.

Основные положения теории β -окисления жирных кислот были сформулированы Кнопом, Эмбденом и Дакиным (1904 г.) и полностью экспериментально подтверждены в пятидесятых годах.

Для включения кислоты в цикл β -окисления необходима ее предварительная активация, которая достигается путем перевода ее в производное КоА. Ферментная система β -окисления специфична для ацил-S-CoA и не реагирует со свободными жирными кислотами. Активация жирных кислот в ацил-S-CoA катализируется двумя различными классами ферментов: ацил-КоА-синтетазами и тиофорозами. Общая реакция, катализируемая ацил-КоА-синтетазами, требует присутствия АТФ и ионов Mg^{2+} :

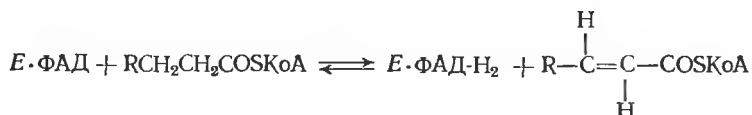


Из животных тканей выделены несколько ацил-КоА-синтетаз, проявляющих специфичность в отношении длины цепи субстрата.

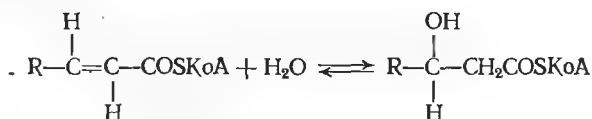
Тиофоразы катализируют перенос остатка КоА от ацил-S-CoA на алифатические кислоты и от сукцинил-S-CoA на β -кетокислоты:



Активированные жирные кислоты далее подвергаются дегидрированию в *транс*- α,β -ненасыщенные ацильные производные КоА. Реакция катализируется различными ацил-КоА-дегидрогеназами (1.3.99.3), которые содержат в качестве кофермента ФАД и обнаруживают специфичность в отношении длины цепи субстрата:

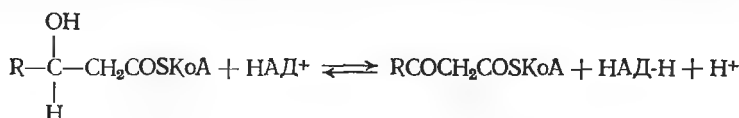


Следующая ступень β -окисления высших жирных кислот включает стереоспецифичную гидратацию ненасыщенного соединения в L - β -оксиацилпроизводное КоА:

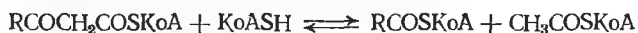


Реакция катализируется ферментом еноил-КоА-гидратазой (4.2.1.17).

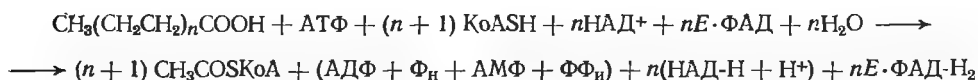
L - β -Оксиацилпроизводное КоА дегидрируется в β -оксоацилпроизводное в присутствии фермента 3-оксиацил-КоА-дегидрогеназы (1.1.1.35), который не проявляет специфичности в отношении длины цепи:



Заключительный этап одного цикла расщепления высшей жирной кислоты состоит в тиолизе β -оксоацилпроизводного КоА под действием фермента 3-кетоацил-КоА-тиолазы (2.3.1.16):



В результате одного цикла β -окисления осуществляется укорачивание цепи жирной кислоты на 2 атома углерода и образуется CH_3COSKoa и восстановленные формы ФАД и НАД. Процесс далее повторяется многократно до полного расщепления кислоты в CH_3COSKoa . Например, в случае пальмитиновой кислоты цикл β -окисления повторяется 7 раз. Суммарная реакция окисления жирных кислот с четным числом атомов углерода до CH_3COSKoa может быть представлена следующим образом (E — фермент):

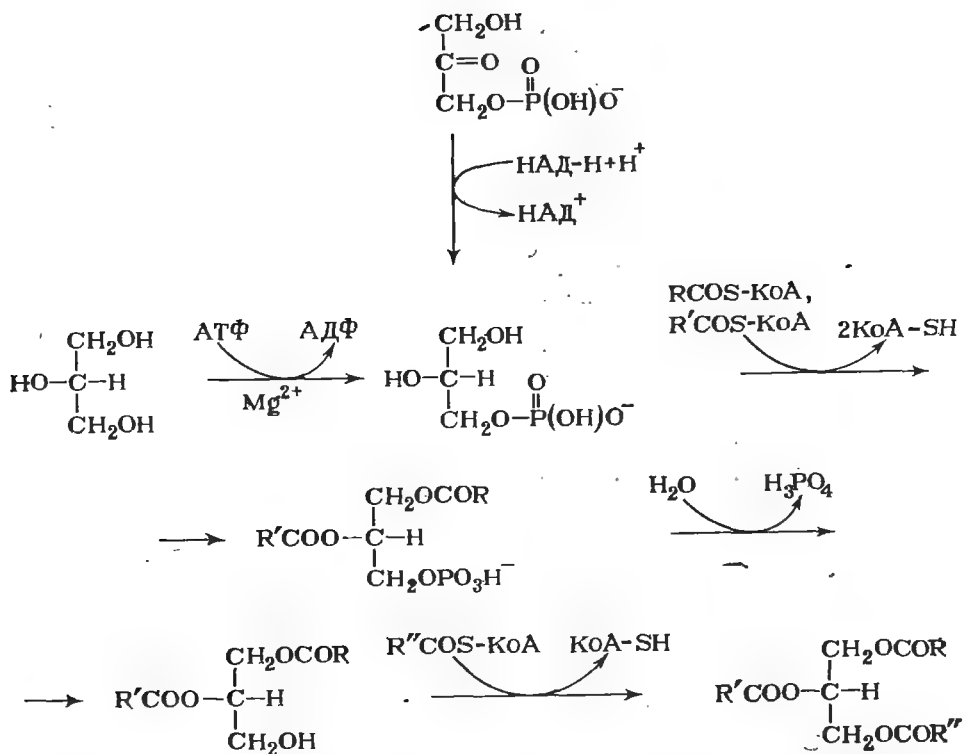


Ацетил-S-КоА далее включается в цикл трикарбоновых кислот, а НАД-Н + H^+ и ФАД- H_2 поступают в цепь переноса электронов.

Окисление жирных кислот с нечетным числом атомов углерода осуществляется аналогично, однако наряду с ацетил-S-КоА конечным продуктом реакции является пропионил-S-КоА, который превращается в сукцинил-S-КоА, вступающий в цикл Кребса.

БИОСИНТЕЗ И КАТАБОЛИЗМ НЕЙТРАЛЬНЫХ ЛИПИДОВ

Триглицериды. Современные представления о биосинтезе триглицеридов базируются на ферментативных реакциях, представленных на следующей схеме [273]:



Ключевым соединением в биосинтезе триглицеридов является *sn*-глицеро-3-фосфат, который образуется либо путем фосфорилирования глицерина АТФ в присутствии фермента глицерокиназы (2.7.1.30), либо восстановлением диоксиацетонфосфата (полупродукт процесса гликолиза), катализируемым глицерофосфатдегидрогеназой (1.1.99.5).

Предшественниками триглицеридов являются фосфатидовые кислоты, которые возникают при ацилировании *sn*-глицеро-3-фосфата ацильными производными КоА. Реакция ацилирования, по-видимому, протекает в две ступени, каждая из которых катализируется определенной глицерофосфат-ацилтрансферазой (2.3.1.15). Точный механизм реакции ацилирования не установлен. Фосфатидовые кислоты под действием специфических фосфатаз, содержащихся в печени, мозге и других тканях, подвергаются дефосфорилированию в 1,2-диацил-*sn*-глицерины, в состав которых входят жирные кислоты различной степени ненасыщенности и длины цепи. Далее 1,2-диацил-*sn*-глицерины этерифицируются КоА-производными высших жирных кислот в присутствии ацил-КоА:1,2-диглицерид-О-ацилтрансфераз (2.3.1.20) в триглицериды [274].

Основные участки биосинтеза триглицеридов локализованы в печени и жировой ткани. В кишечном тракте наряду с указанным путем биосинтеза триглицеридов наблюдается процесс, основанный на непосредственной этерификации моноглицеридов ацильными производными КоА в диглицериды в присутствии ацил-КоА:моноглицеридацилтрансферазы с последующим ацилированием их в триглицериды. Однако указанный путь биосинтеза триглицеридов имеет второстепенное значение.

Основная функция триглицеридов состоит в том, что они служат компактной формой хранения энергии в животных и растительных орга-

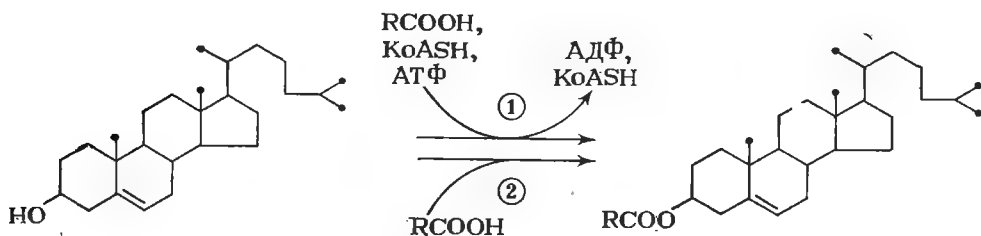
низмах. Они рассматриваются как динамические элементы клетки, в отличие от фосфолипидов, которые являются «постоянными» компонентами клеточных структур.

Триглицериды жировых депо (запасный или резервный жир) могут потребляться при голодании, физической работе и других состояниях организма, требующих затраты энергии. Запасы их пополняются после потребления пищи и, таким образом, они являются буфером в процессе накопления и использования энергии в организме.

Гидролиз триглицеридов, поступающих в организм с пищей, происходит в основном в тонком кишечнике под действием липолитических ферментов, выделяемых поджелудочной железой и известных под названием панкреатических липаз [275, р. 135]. Панкреатические липазы проявляют специфичность в отношении первичных сложноэфирных групп и гидролизуют триглицериды в 2-моноглицериды, которые постепенно расщепляются в глицерин и жирные кислоты. Эффективное расщепление триглицеридов липазами достигается в присутствии солей желчных кислот, которые способствуют образованию эмульсий. Полученные моно- и диглицериды, а также длинноцепные жирные кислоты (более C_{12}) всасываются в тонком кишечнике, а глицерин и жирные кислоты с короткой цепью (менее C_{14}) переносятся кровью в печень. Триглицериды, синтезированные в слизистой кишечника, в виде хиломикронов (липопротеидные частицы, содержащие 90% триглицеридов) попадают в кровь через лимфатическую систему [276, р. 179].

Расщепление триглицеридов под действием липолитических ферментов является обратимым процессом, хотя существенного значения для синтеза триглицеридов это не имеет [277].

Эфиры холестерина. Как известно, значительная часть холестерина в животном организме присутствует в виде эфиров высших жирных кислот. Обнаружено, что в организме биосинтез эфиров холестерина осуществляется двумя путями:



В опытах *in vitro* показано, что ферментная система, выделенная из митохондрий и микросом печени, катализирует этерификацию холестерина с помощью ацильных производных КоАШ (фермент ацил-КоА-холестерол-ацилтрансфераза) (путь 1). Холестерол-эстераза (3.1.1.13) из поджелудочной железы катализирует непосредственную этерификацию холестерина высшими жирными кислотами (путь 2), причем наряду с синтетической активностью проявляет гидролитическую, т. е. расщепляет эфиры холестерина.

Фермент из микросом печени также гидролизует эфиры холестерина, но с меньшей скоростью, не обладает необходимой специфичностью и может гидролизовать и другие эфиры высших жирных кислот.

Нейтральные гликолипиды. Моногликозиддиглицериды, например 1,2-диацил-3-О-(β-D-галактозил)-sn-глицерин, синтезируются при уча-

стии УДФ-галактозы, которая осуществляет перенос гликозильного остатка, в частности галактозы, на 1,2-диацил-*sn*-глицерин. Подобный процесс изучен, например, с ферментной системой, выделенной из микросомальной фракции мозга крыс.

Переход от моногалактозилдиглицерида к дигалактозилдиглицериду — 1,2-диацил-3-О-(α -D-галактозил- β -D-галактозил)-*sn*-глицерину — осуществляется взаимодействием с УДФ-галактозой в присутствии определенной галактозилтрансферазы. Подобный галактозилтрансферазный путь биосинтеза дигалактозилдиглицеридов изучен в растительной и животной клетках [277].

Расщепление моно- и дигалактозилдиглицеридов катализируется определенными галактолипазами и α - и β -галактозидазами (3.2.1.22; 3.2.1.23). Так, исследовано расщепление этих соединений с помощью ферментных систем из мозга крыс и показано, что галактозидазная активность обнаружена в митохондриальной фракции мозга ($\text{pH}_{\text{опт}}$ 4,4), а галактолипазная активность — в микросомальной фракции (pH 7,2) [278].

Общая схема биосинтеза и катаболизма нейтральных гликолипидов приведена на стр. 355.

БИОСИНТЕЗ И КАТАБОЛИЗМ ФОСФОЛИПИДОВ

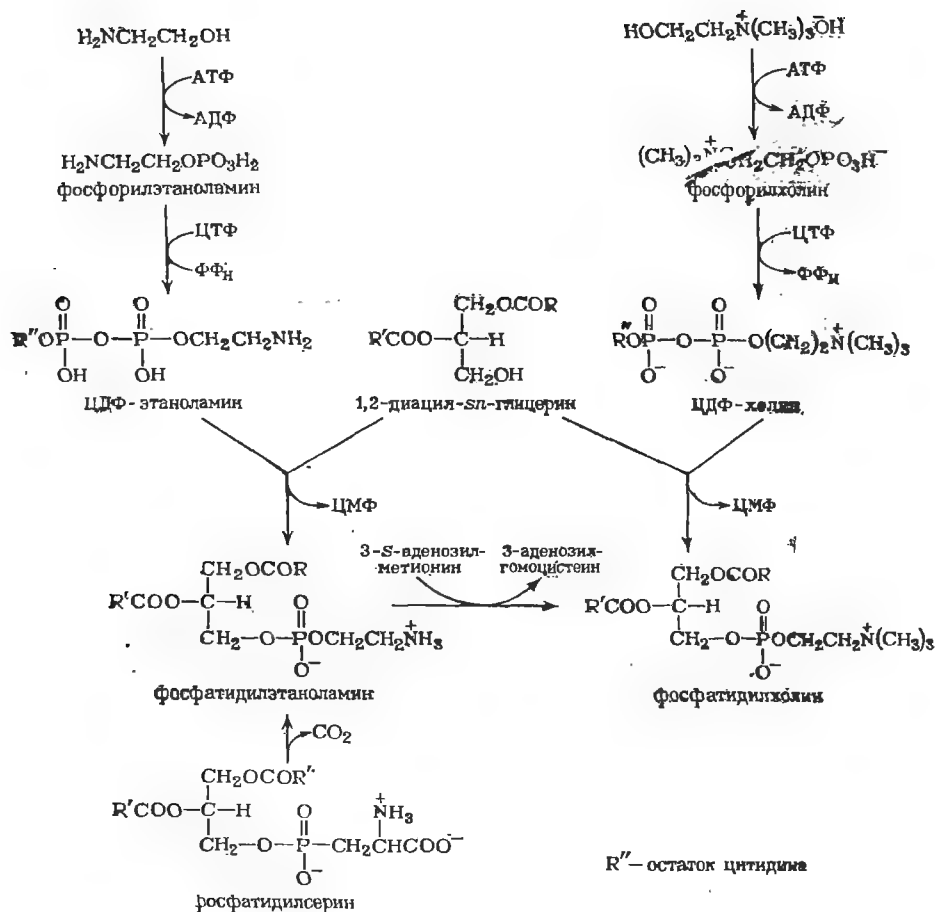
Биосинтез фосфолипидов преимущественно осуществляется в печени, ткани кишечника, почках, мышечной ткани, в меньшем масштабе — в мозге. Способность мозга синтезировать фосфолипиды в значительной степени определяется возрастом организма. Максимальная скорость биосинтеза наблюдается у животных в период миелинизации ткани мозга. Высокая скорость образования фосфолипидов характерна для злокачественных опухолей. При переходе органов от состояния физиологического покоя к возбуждению повышается скорость обменных превращений фосфолипидов.

В настоящее время установлено, что основную роль в биосинтезе фосфолипидов выполняют цитидиновые нуклеотиды, с помощью которых осуществляется построение фосфодиэфирных связей в живой клетке [279, р. 97].

Фосфатидилэтаноламин и фосфатидилхолин. Биосинтез фосфолипидов, содержащих азотистые основания (этаноламин и холин), осуществляется по общему пути, включающему следующие этапы [275, р. 135]: 1) образование монофосфатов, 2) взаимодействие монофосфатов оснований с ЦТФ с образованием ЦДФ-оснований, 3) перенос остатка фосфата основания от ЦДФ-основания на 1,2-диацил-*sn*-глицерин (см. стр. 357).

Этаноламин, поступающий в организм с пищей или синтезируемый из серина и глицина, фосфорилируется АТФ в присутствии этаноламинфосфокиназы в фосфорилэтаноламин. Последний вступает во взаимодействие с ЦТФ под влиянием этаноламинфосфат-цитидилилтрансферазы (2.7.7.14) с образованием ЦДФ-этанолamina, который далее реагирует с 1,2-диацил-*sn*-глицерином, давая фосфатидилэтаноламин и ЦМФ.

Аналогично первая ступень биосинтеза лецитинов включает фосфорилирование холина с помощью АТФ в присутствии холинкиназы (2.7.1.32), найденной в печени и дрожжах. Далее осуществляется перенос цитидильной части ЦТФ к фосфорилхолину при участии холинфосфат-цитидилилтрансферазы (2.7.7.14), что приводит к возникновению нового ко-



фермента — ЦДФ-холина. ЦДФ-Холин далее взаимодействует с 1,2-диацил-*sn*-глицерином.

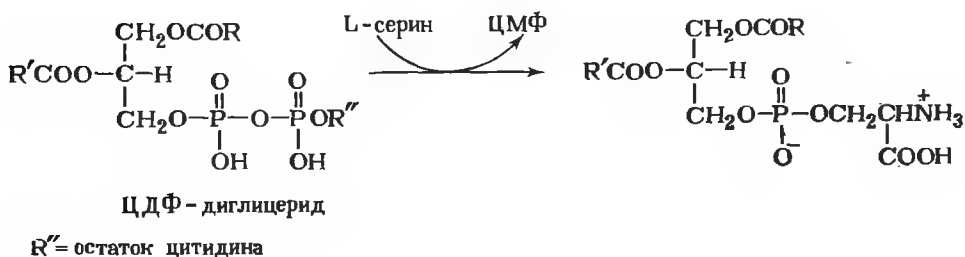
Наряду с биосинтезом *de novo* фосфатидилэтанолamina и фосфатидилхолина в организме происходит образование данных классов фосфолипидов за счет обменных реакций и взаимопревращений фосфолипидов. Рядом исследователей изучен переход от фосфатидилэтанолamina к фосфатидилхолину через промежуточные стадии образования N-метил- и N,N-диметилфосфатидилэтанолaminов. Ферментная система, необходимая для этого превращения (фосфатидилэтанолaminметилтрансфераза), локализована в микросомальной фракции печени и использует S-аденозилметионин в качестве донора метильных группировок.

Некоторое количество фосфатидилэтанолamina в организме образуется за счет декарбоксилирования фосфатидилсерина при участии фосфатидилсериндекарбоксилазы, обнаруженной в печени, мозге и других тканях.

Превращение фосфатидилэтанолamina в лецитин и фосфатидилсерина в фосфатидилэтанолamin в организме следует рассматривать не как путь их биосинтеза, а скорее как путь превращения одних фосфолипидов в другие, поскольку образование новых фосфодифириных связей в молекуле фосфолипидов может происходить только в результате реак-

цитинов можно предположить, что биосинтез серинфосфатидов включает стадии образования фосфата серина и цитидиндифосфата серина (ЦДФ-серин). Присутствие в различных тканях активных фосфосеринфосфатаз, которые способны катализировать гидролиз фосфата серина и обмен *D*- и *L*-серина с фосфатом серина, свидетельствует, что фосфатидилсерин образуется с помощью метаболического пути, отличного от пути биосинтеза фосфатидилхолина или фосфатидилэтаноламина.

Изучение биосинтеза фосфатидилсерина в опытах *in vitro* с ферментной системой из *E. Coli* показало, что синтез этого фосфолипида происходит при реакции ЦДФ-диглицерида и *L*-серина [281]:



Наличие подобного взаимодействия подтверждено выделением ЦМФ в процессе реакции. Ферментная система, катализирующая реакцию, показывает оптимальную активность в присутствии неорганических солей, например сульфата натрия, и некоторых органических растворителей (октиловый спирт и др.). Возможно, что этот путь биосинтеза фосфатидилсерина имеет место и в животном организме.

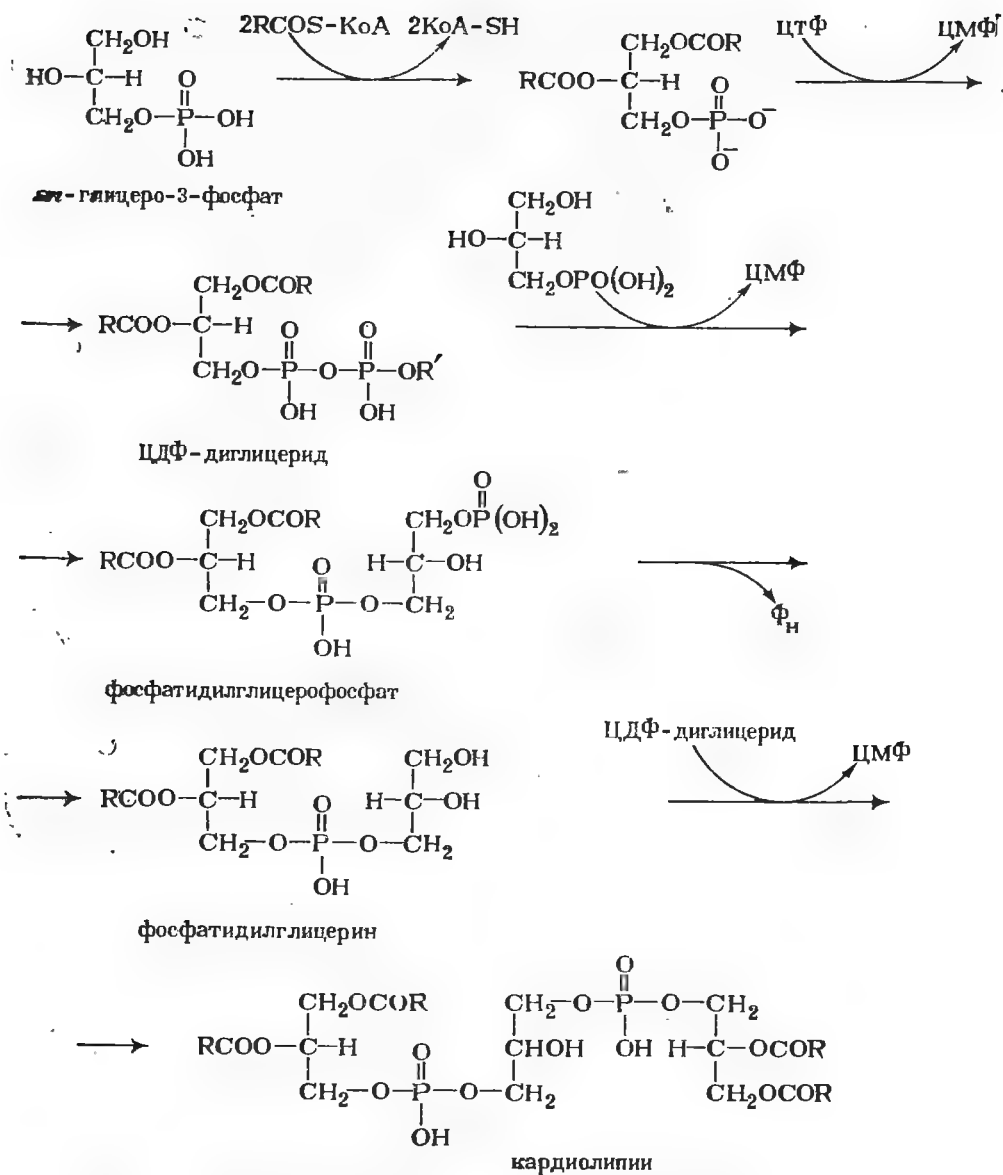
Определенная роль в образовании фосфатидилсерина в организме отводится обменной реакции между фосфатидилэтаноламином и *L*-серинном. Подобный обмен катализирует ферментная система из печени; фермент вполне специфичен и неактивен к *D*-серину и холину.

Расщепление фосфатидилсерина в организме происходит аналогично распаду фосфатидилхолина и фосфатидилэтаноламина, однако с меньшей скоростью.

Полиглицерофосфатиды. Биосинтез полиглицерофосфатидов, как и фосфатидилсерина, осуществляется при участии ЦДФ-диглицерида, который в свою очередь образуется при реакции фосфатидовой кислоты и ЦТФ. Кроме того, возможно образование ЦДФ-диглицерида из фосфатидовой кислоты и ЦДФ-холина.

Биосинтез фосфатидилглицерина осуществляется в два этапа. Первый включает взаимодействие ЦДФ-диглицерида и *sn*-глицеро-3-фосфата, приводящее к фосфатидилглицерофосфату. На второй ступени биосинтеза осуществляется ферментативное дефосфорилирование фосфатидилглицерофосфата в фосфатидилглицерин. По-видимому, ферменты, катализирующие эти реакции, локализованы главным образом в митохондриях. Фосфатидилглицерофосфат обнаружен в ряде природных источников, что служит косвенным подтверждением указанного пути биосинтеза фосфатидилглицерина [282].

Переход от фосфатидилглицерина к кардиолипину осуществляется повторной реакцией с ЦДФ-диглицеридом:



Показана также возможность биосинтеза кардиолипина без участия цитидиновых нуклеотидов [283]:



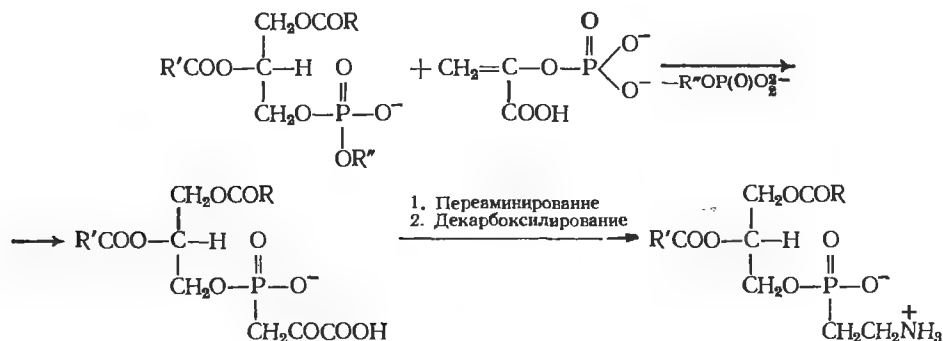
Это превращение катализируется фосфолипазой.

Механизм биосинтеза О-аминокислотных эфиров фосфатидилглицерина изучен на примере лизинового эфира, продуцируемого *St. aureus*. Показано, что биосинтез является двухстадийным процессом. На первой стадии, которая катализируется растворимым ферментом и требует присутствия АТФ, лизин активируется с образованием лизил-т-РНК. Последний далее взаимодействует с фосфатидилглицерином с образованием соответствующего эфира. Для протекания этой реакции необходимо

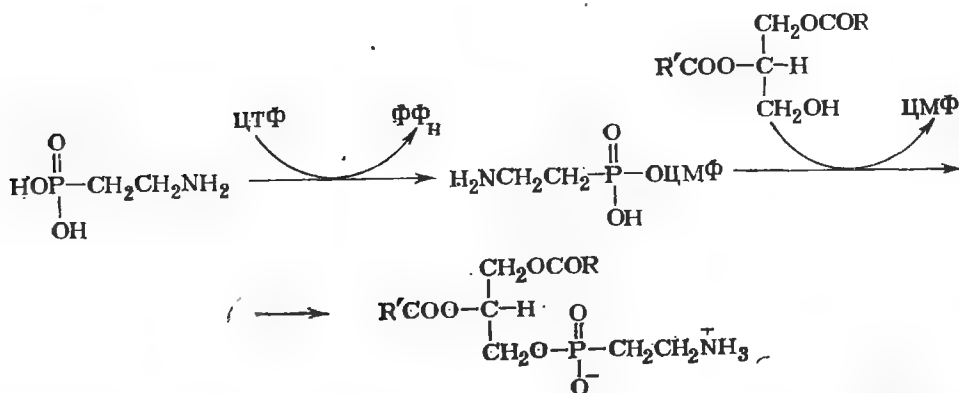
присутствие ионов Mg^{2+} , неидентифицированного термостойкого диализуемого фактора, анионных поверхностно-активных веществ и фосфатидилглицерина.

Распад полиглицерофосфатидов осуществляется под действием липолитических ферментов, как и в случае глицерофосфолипидов (см. стр. 288).

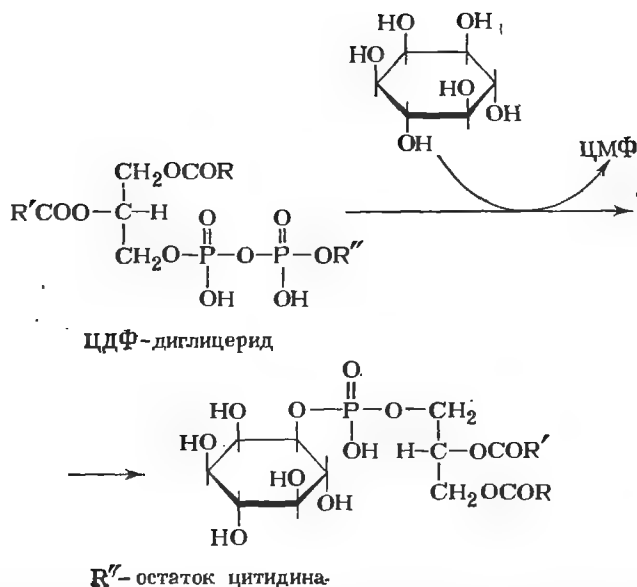
Фосфонолипиды. Вопрос о путях биосинтеза фосфонолипидов окончательно не решен. Один из возможных механизмов биосинтеза фосфоноаналога фосфатидилэтаноламина предполагает, что при взаимодействии фосфолипида и фосфоенолпирувата в липид вводится $C-P$ -связь. Последующее переаминирование и декарбоксилирование дают фосфонатный аналог фосфатидилэтаноламина [284]:



В экспериментах *in vitro* было продемонстрировано образование фосфонокефалина из 1,2-диацил-*sn*-глицерина и ЦМФ- (2-аминоэтил)-фосфоната по пути, аналогичному образованию фосфатидилэтаноламина:



Фосфоинозитиды. Центральная роль в биосинтезе фосфоинозитидов, как и в биосинтезе полиглицерофосфатидов, отводится ЦДФ-диглицериду. Установлено, что биосинтез родоначальника фосфоинозитидов — фосфатидилмиоинозита — осуществляется путем переноса фосфатидильной группы от ЦДФ-диглицерида к свободному миоинозиту [285]:



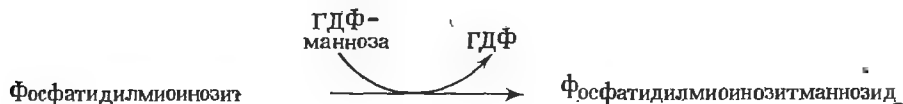
Используя ЦТФ, меченный по α-атому фосфора, наблюдали [286] образование радиоактивного ЦДФ-диглицида, причем при добавлении инозита количество этого соединения резко уменьшалось, что свидетельствовало об его участии в биосинтезе инозитлипидов. Реакция синтетического ЦДФ-диглицида с миоинозитом в присутствии ферментной системы печени приводила к фосфатидилмиоинозиту, причем контроль реакции осуществлялся с помощью спектрофотометрической идентификации ЦМФ, возникающего в процессе данных превращений.

Рядом экспериментов с радиоактивными предшественниками с помощью ферментной системы из мозга крыс показано, что фосфорилирование 1-фосфатидилмиоинозита в 1-фосфатидилмиоинозит-4-фосфат и далее в 1-фосфатидилмиоинозит-4,5-дифосфат идет ступенчато; донором фосфатной группировки служит АТФ [287]. Наряду с фосфорилированием идет и дефосфорилирование:



Моно- и полифосфоинозитиды расщепляются с помощью фосфоинозитидинозитфосфогидролазы с образованием 1,2-диацил-*sn*-глицерина и миоинозитфосфатов.

Биосинтез фосфатидилманнопиранозилмиоинозита из *Mycobacterium phlei*, вероятно, происходит последовательным присоединением остатков маннозы к фосфатидилмиоинозиту:

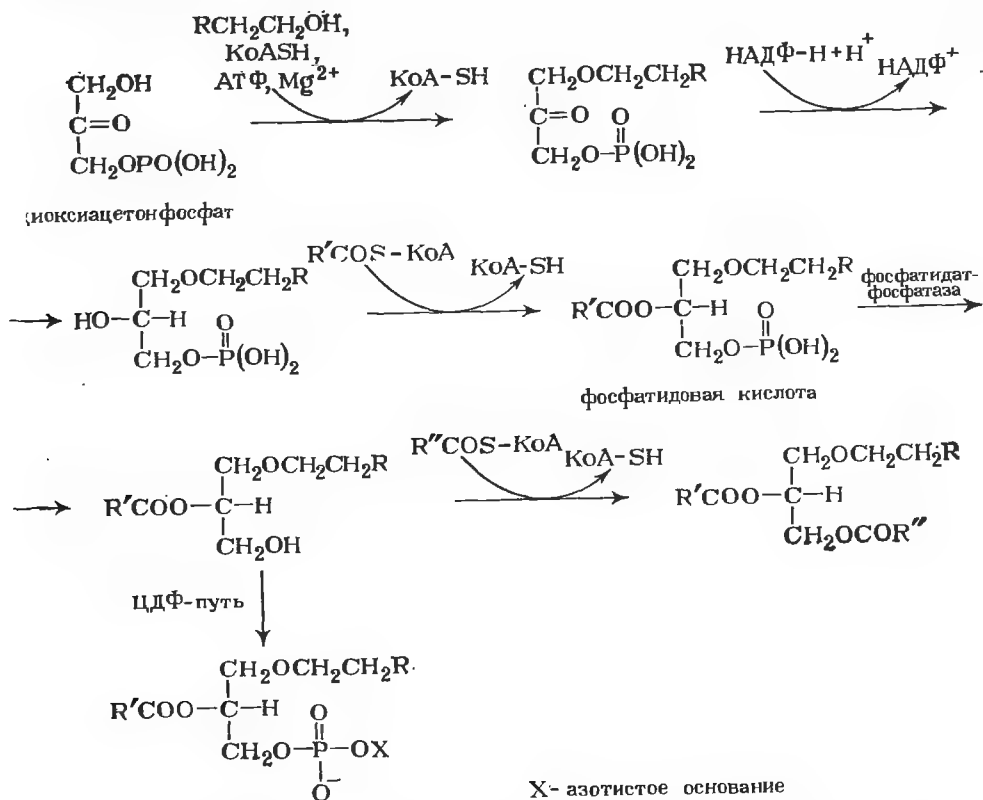


БИОСИНТЕЗ И КАТАБОЛИЗМ ЛИПИДОВ С ПРОСТОЙ ЭФИРНОЙ СВЯЗЬЮ

Липиды с простой и сложной эфирными связями, по-видимому, находятся в определенном биогенетическом родстве, о чем свидетельствует ряд факторов. Так, они найдены в одних и тех же источниках, наблюдается

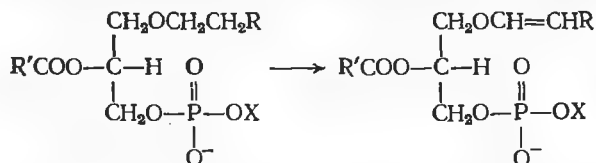
большое сходство в жирнокислотном составе этих липидов, отмечается также соответствие альдегидного состава плазмалогенов (в одном и том же источнике) жирнокислотному составу (при C_{11}) соответствующих ацильных аналогов. О биогенетическом родстве ацильных, алкильных и алкен-1-ильных форм свидетельствует и их структурное сходство: наличие одинаковой оптической конфигурации, присутствие одних и тех же заместителей в фосфорсодержащей части молекулы (азотистые основания, аминокислоты, полиолы). Однако вопрос о том, как осуществляются биогенетическая связь и взаимопревращения липидов с простой и сложной эфирными связями, до сих пор не выяснен. Большинство исследований по биосинтезу липидов с простой эфирной связью основано на введении радиоактивных предшественников (альдегидов, спиртов и кислот) в целые клетки или ткани и изучении распределения радиоактивной метки в нейтральных и фосфолипидных фракциях [173].

Описан микросомальный ферментный комплекс [287], который синтезирует О-алкильную связь в глицеролипидах нормальных и неопластических клеток, причем предшественником алкильной цепи служат высшие спирты алифатического ряда, образующиеся путем восстановления высших жирных кислот. Предполагаемый путь биосинтеза алкильных липидов идет по схеме: —



Механизм биосинтеза альдегидогенных липидов до сих пор окончательно не выяснен. В настоящее время наиболее достоверной кажется теория биосинтеза альдегидогенных липидов, основанная на переходе к ним от алкильных липидов [289]. Однако вопрос о том, на какой ступе-

ни биосинтеза осуществляется биогидрирование алкильных производных глицерина в 1-алкенильные, не известен, хотя указывается на возможность биогидрирования на целой молекуле алкилацилфосфолипидов:



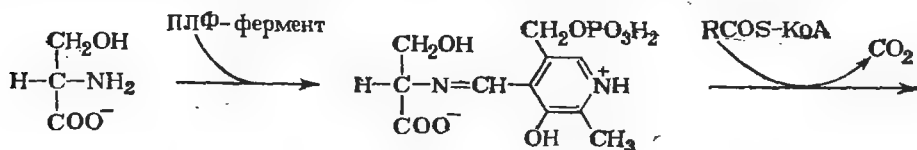
В связи с многочисленностью и противоречивостью результатов, полученных при изучении биосинтеза липидов с простой эфирной связью, возникает предположение, что природа, видимо, располагает несколькими путями биосинтеза этих соединений.

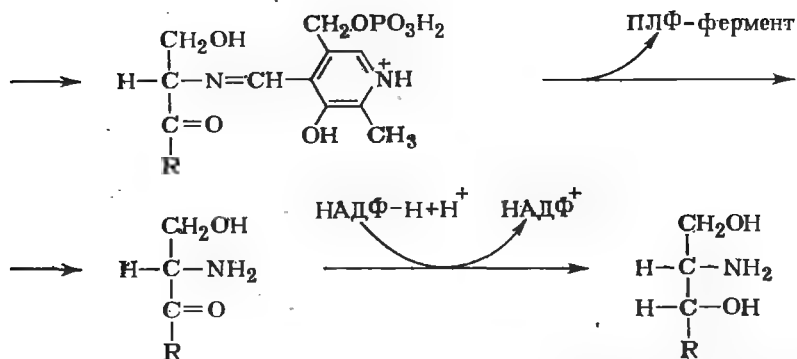
Катаболизм липидов с простой эфирной связью в организме изучен в меньшей степени, чем для липидов со сложной эфирной связью [173]. Расщепление нейтральных липидов с простой эфирной связью (алкилдиацилглицерины и нейтральные плазмалогены) происходит под действием панкреатических липаз, которые активны к первичной сложноэфирной группировке, но не атакуют О-алкильные и О-алкен-1-ильноэфирные связи. Замена жирнокислотного остатка в фосфолипидах на алкильную и алкенильноэфирные группы не изменяет специфичности действия фосфолипаз A₂, C, D (стр. 271), но существенно сказывается на скорости ферментативного гидролиза [290].

Данные о ферментных системах, вызывающих расщепление О-алкильной и О-алкен-1-ильноэфирной связей, крайне ограничены. Так, известно, что ферментная система кишечника крыс расщепляет О-алкенильную связь алкильных липидов с образованием спиртов. Предполагают, что микросомальная ферментная система из печени крыс катализирует расщепление О-алкенильной связи через стадию образования полуацетала, который далее гидролизует в альдегид. Микросомальная ферментная система из печени крыс содержит так называемую алкенилглицерофосфориолхилингидролазу, которая расщепляет алкенильноэфирную связь лецитин-плазмалогенов и соответствующего лизосоидения с образованием альдегида. Аналогично действует на кефалин-плазмалогены ферментная система мозга крыс.

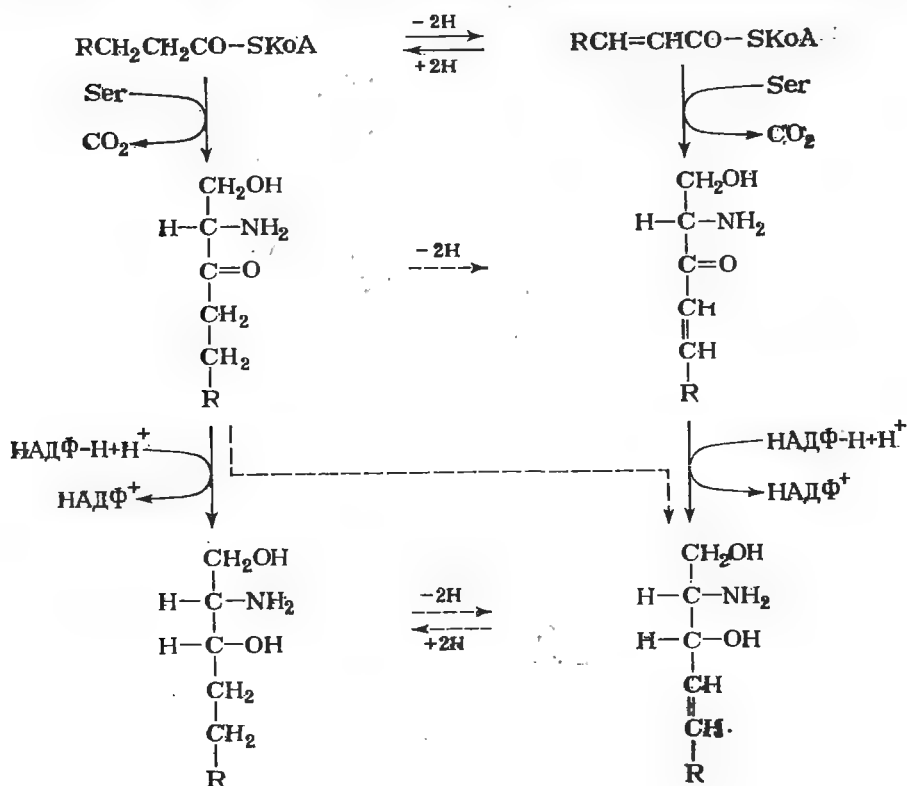
БИОСИНТЕЗ И КАТАБОЛИЗМ СФИНГОЛИПИДОВ [291]

Сфингозинные основания. Биохимические исследования с использованием меченых соединений показали, что предшественниками первого и второго атомов углерода сфингозиновых оснований являются второй и третий атомы углерода серина, а третий атом углерода сфингозиновых оснований включается из пальмитиновой кислоты или ацетата. Таким образом, в биосинтезе сфингозиновых оснований принимают участие серин и высшая жирная кислота в виде ацилкофермента А:

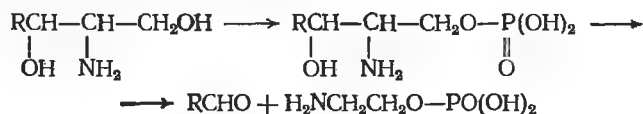




Фермент, осуществляющий С-ацилирование серина, содержит в качестве кофактора пиридоксальфосфат. Образующееся при этом 3-оксoproизводное является важнейшим биологическим предшественником сфингозиновых оснований трех основных типов: сфинганина, 4-сфингенина и 4-оксисфингенина. 3-Оксoproизводное превращается в сфинганин путем восстановления с помощью фермента, зависящего от НАДФ-Н; сфинганин может далее дегидрироваться в 4-сфингенин, который, по-видимому, способен гидроксилироваться до 4-оксисфингенина [292]. Полной ясности в этих представлениях еще нет, поскольку существует несколько возможностей взаимного превращения насыщенных и ненасыщенных оксидов окиссоединений [292] (часть из них подтверждена экспериментально):



При изучении распада сфингозиновых оснований обнаружено, что первой стадией превращения является фосфорилирование в присутствии АТФ и Mg^{2+} с помощью фермента фосфотрансферазы. Далее следует распад на фрагмент C_2 (фосфорилэтаноламин) и высший жирный альдегид под действием альдолазы:

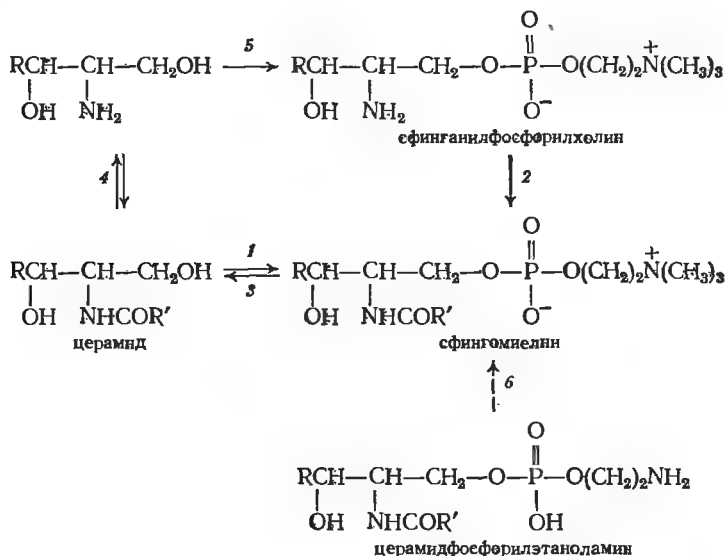


В настоящее время доказано, что фосфорилэтаноламин — продукт деградации сфингозиновых оснований — используется клеткой как источник этаноламина в биосинтезе фосфатидилэтаноламина и фосфатидилхолина в печени и мозге крыс. Вероятно, это дополнительная возможность синтеза этаноламина, которая существует параллельно с декарбоксилированием серина.

Еще более важным продуктом распада сфинголипидных оснований являются высшие жирные альдегиды, которые легко восстанавливаются в спирты или окисляются в жирные кислоты. Показано, что пальмитиновый альдегид, который был получен при деградации сфинганина, более активен как предшественник алкен-1-иловых эфиров глицерина, чем пальмитиновая кислота.

Таким образом, обмен сфинголипидов тесно связан с биосинтезом основных классов глицерофосфатидов.

Сфингомиелины. Биосинтез сфингомиелинов может осуществляться из церамида в присутствии церамидфосфорилхолинтрансферазы и ЦДФ-холина (реакция 1) или из сфинганилфосфорилхолина и ацил-КоА (реакция 2). Под действием фермента сфингомиелиназы (фосфолипаза типа С) при pH 5 происходит гидролиз сфингомиелина с образованием фосфорилхолина и церамида (реакция 3). Этот фермент специфичен к *D*-эритро-конфигурации субстрата. Фермент церамидаза [293] катализирует как распад, так и биосинтез церамида без участия КоА (реакция 4).



Сфинганилфосфорилхолин синтезируется из основания и ЦДФ-холина (реакция 5). Возможно также, что биосинтез сфингомиелина осуществляется путем метилирования церамидфосфорилэтаноламина (реакция 6).

Многочисленные эксперименты, проводимые с мечеными субстратами, показали, что в отличие от многих глицерофосфолипидов сфингомиелин метаболически инертен. Так, при изучении скорости включения ^{32}P в мозг крыс было установлено, что включение неорганического фосфата в сфингомиелин происходит в 2—3 раза медленнее, чем в лецитин, и снижается с увеличением возраста животных несмотря на повышение общего содержания сфингомиелина в головном мозге. Особенно медленно обмен идет в миелине.

С нарушением обмена сфингомиелина связано одно из сильнейших психических расстройств с летальным исходом — заболевание Ниманна—Пика, характеризующееся накоплением сфингомиелина в клетках нервной и ретикуло-эндотелиальной систем, а также в других органах. Так, общее количество сфингомиелина в мозге при заболевании Ниманна—Пика увеличивается более чем в 10 раз по сравнению с нормальным содержанием в мозге ребенка и в 2,5 раза по сравнению с мозгом взрослого. В остальных тканях (печень, почки, легкие и, особенно, селезенка) общее количество сфингомиелина превышает норму в 10—40 раз [294]. Показано, что заболевание сопровождается падением активности фермента сфингомиелиназы.

Несмотря на то, что уже накоплен достаточно богатый материал о биосинтезе и распаде сфингомиелинов под действием ферментов, выделенных из тканей животных и клеток бактерий, биологическая роль сфингомиелинов окончательно не выяснена.

Гликоcsфинголипиды. Биосинтез гликоcsфинголипидов протекает с участием ацилкофермента А, сфингозиновых оснований и УДФ-сахаров. Нейраминовая кислота включается в виде ЦМФ-производного. Общая картина путей биосинтеза гликоcsфинголипидов [291] представлена на стр. 368.

Ключевыми соединениями в этой схеме являются церамид и лактозилцерамид. Биосинтез гликоcsфинголипидов проходит через ступенчатое присоединение сахаров к гликолипидному акцептору. Ряд промежуточных этапов биосинтеза еще подлежит уточнению.

Пути распада гликоcsфинголипидов также интенсивно изучаются. Хорошо изучен ряд ферментов, например церебровидазы, гидролизующие церебровиды, и нейраминидазы, отщепляющие сиаловые кислоты от ганглиозидов.

В последние годы возрос интерес к подобным исследованиям, так как установлено, что ряд наследственных заболеваний — липидозов — связан непосредственно с нарушением метаболизма гликоcsфинголипидов. В тех случаях, когда причины заболевания выяснены, оказалось, что наследственные дефекты вызывают недостаток специфических ферментов типа гликозидаз. Это приводит к ненормальному накоплению в определенных тканях или органах того или иного гликоcsфинголипида [295]. Так, болезнь *Tay-Sachs* — перерождение сетчатой субстанции мозга (характеризуется слепотой, параличом) связана с ненормальным накоплением ганглиозидов в мозговых тканях, причем доминирует один из видов моносиалоганглиозидов. При болезни *Gaucher* в клетках ретикулоэндотелиальной системы накапливаются церебровиды, в составе которых преобладает глюкоза вместо галактозы. При метакроматической лейкодистрофии в мозгу накапливаются сульфатиды, в то время как содержание церебровидов сохраняется на уровне нормального. По-видимому, в этом случае нарушен процесс удаления сульфогруппы при распаде. Болезнь *Fabry* характеризуется накоплением тригексозилцерамида в стенках всех клеток,

Это свойство и положено в основу классификации липид-белковых комплексов [296, р. 18]. Биоконплексы, приближающиеся по растворимости к белкам, т. е. растворимые в воде и водных растворах солей, классифицируют как *липопротеиды*. Напротив, комплексы, приближающиеся по растворимости к липидам, т. е. растворимые в органических растворителях и нерастворимые в воде, называют *протеолипидами*. Эти соединения предпочтительно присутствуют в белом веществе головного мозга, небольшие количества их найдены и в других тканях организма.

Различают два основных типа природных липопротеидов [297]: липопротеиды плазмы, к которым относятся комплексы, диспергированные в водной фазе крови и тканевых жидкостей, и липопротеиды клеточных структур, так называемые ламеллярные липопротеиды, составляющие структурную основу клеточных мембран.

ЛИПОПРОТЕИДЫ ПЛАЗМЫ

В плазме лишь небольшое количество липидов присутствует в свободном состоянии в форме липидных мицелл, основное количество их найдено в виде липопротеидов. Белки способствуют переводению липидов в растворимую форму, что облегчает их транспорт кровью.

Природные липопротеиды лабильны, поскольку их структурная организация в основном обеспечивается различными типами слабых взаимодействий. В связи с этим в условиях выделения возможны различные изменения нативной структуры липопротеидов, что затрудняет проведение структурных исследований.

Липопротеиды плазмы неоднородны и могут быть разделены на ряд классов. Наиболее распространенными и надежными методами фракционирования липопротеидов плазмы являются ультрацентрифугирование и электрофорез.

Разделение липопротеидов плазмы с помощью ультрацентрифугирования основано на существенном различии в плотности липидов и белков (соответственно 0,88—1,06 и 1,30—1,35). Различные классы липопротеидов плазмы, имеющие разное соотношение липид : белок, характеризуются определенными значениями плотностей. Один из вариантов этого метода включает измерение скорости флотации (в единицах Сведберга, S_f)* липопротеидов в водной среде данной однородной плотности. Величина S_f зависит от плотности, размера и формы молекулы липопротеида. Липопротеиды наиболее низкой плотности (низкое отношение белок : липид) имеют наибольшее значение S_f . Другой вариант основан на центрифугировании по градиенту плотности. С этой целью плотность плазмы ступенчато повышают добавлением растворов веществ, не влияющих на ее свойства, в результате чего липопротеиды в процессе ультрацентрифугирования концентрируются в виде полос в тех местах раствора, где его плотность соответствует плотности липопротеида.

Для выделения, очистки и проверки гомогенности отдельных классов липопротеидов плазмы используют также электрофорез на различных носителях (бумага, ацетат целлюлозы, агар-агар, акриламид и т. д.). Разделение липопротеидов плазмы на классы и очистка возможны и с помощью методов осаждения [298, р. 15]. Наиболее распространенный вариант их основан на способности липопротеидов образовывать нерастворимые комплексы с различными полимерами: поликатионами (поливинилпирролидон и др.), полианионами (сульфаты полисахаридов) и

* S_f — скорость флотации при центрифугировании в растворе NaCl (плотность 1,063 при 26 °C).

т. д. Для очистки липопротеинов в последние годы начали применять хроматографические методы и гель-фильтрацию.

Совокупность указанных физических методов (в основном, ультрацентрифугирование и электрофорез) позволила разделить липопротеиды плазмы на четыре функционально важных класса с различными физическими и химическими свойствами (табл. 19).

Таблица 19. Физические и химические свойства липопротеинов плазмы крови человека

Название	Плотность, г/см ³	S _f	Состав, % сухой массы				
			белки	фосфолипиды	холестерин	эфир-холестерина	триглицериды
Липопротеид высокой плотности (α-лиipoproteид)	1,063—1,210	—	45—55	30	3	15	5—8
Липопротеид низкой плотности (β-лиipoproteид)	1,006—1,063	0—20	20—25	22	8	35	10
Липопротеид очень низкой плотности (пре-β-лиipoproteид)	0,930—1,006	20—400	2—13	10—25	3—8	6—16	50—80
Хиломикроны	0,950	400×10 ⁶	0,5—2,5	3—15	1—5	1—7	79—95

Первый функционально важный класс липопротеинов плазмы человека носит название липопротеинов высокой плотности или α-лиipoproteинов. При электрофорезе на бумаге или крахмале подвижность этих липопротеинов соответствует подвижности α-глобулинов (обнаруживаются обычно в виде двух полос).

Экстракцией этих липопротеинов растворителями удаляется липидная часть и остается белок, так называемый аполиipoproteид А. Он проявляет склонность вновь взаимодействовать с липидами с образованием липопротеида. Аполиipoproteид А построен из нескольких полипептидных цепей (до десяти), которые содержат с N-конца аспарагиновую кислоту, а с С-конца — треонин.

Липопротеиды низкой плотности, иначе называемые β-лиipoproteидами, обнаруживают при электрофорезе подвижность β-глобулинов, имеют молекулярную массу (1,3—3,2) · 10⁶. Аполиipoproteид В, получаемый после удаления липидов из β-лиipoproteида, содержит две полипептидные цепи, у каждой из которых на N-конце находится глутаминовая кислота, а на С-конце — серин [299].

Липопротеиды очень низкой плотности (пре-β-лиipoproteиды) представляют собой частицы крупного размера, химический состав которых может существенно меняться. В пре-β-лиipoproteидах с наибольшей плотностью белок составляет около 13% сухой массы, а триглицериды — 50%, в то время как в молекулах с наименьшей плотностью белок составляет лишь 2% сухой массы, а триглицериды — 80%. Пре-β-лиipoproteиды содержат аполиipoproteиды В.

Хиломикроны содержат большие количества триглицеридов (75—95%) и небольшие количества белка, холестерина и фосфолипидов [300, p. 128]. Лимфатические хиломикроны имеют при электрофорезе подвижность альбумина, тогда как плазматические хиломикроны обладают подвижностью α₂-глобулинов.

Описанные классы липопротеинов присутствуют в плазме крови всех млекопитающих. Содержание различных классов липопротеинов у людей

зависит от возраста, пола, условий жизни и т. д. и изменяется при некоторых паталогических состояниях организма. Так, в плазме крови больных инфарктом миокарда увеличивается содержание липопротеидов низкой плотности.

Каждый из четырех перечисленных классов липопротеидов не является гомогенным, а содержит в свою очередь фракции с различными хромографическими, электрофоретическими и иммунологическими свойствами. Так, β -липопротеид состоит из двух фракций, отличающихся по составу аполипопротеидов. Пре- β -липопротеиды включают два типа частиц, отличающихся размерами, плотностью, а также составом и свойствами апопротеидов.

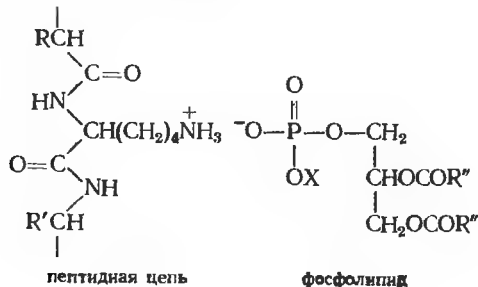
Для хиломикронов характерно наличие частиц одинакового состава, но различного размера. Разные классы липопротеидов характеризуются специфическим составом липидов [298]. Так, в хиломикронах и пре- β -липопротеидах преобладают триглицериды, а в α -липопротеидах — фосфолипиды (до 30%). Для β -липопротеидов характерно высокое содержание эфиров холестерина (до 35%).

Основная часть фосфолипидов представлена фосфатидилэтанолaminaми, лецитинами и сфингомиелинами. В значительно меньших количествах присутствуют плазмалогены, фосфоинозитиды и фосфатидилсерин (суммарно до 2%). Состав липидов в различных классах липопротеидов подвержен значительным индивидуальным колебаниям в зависимости от возраста, пола и других факторов.

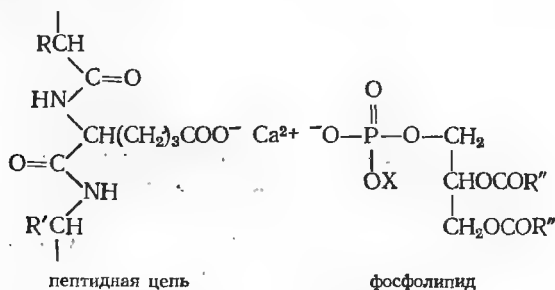
При изучении белковой части рассмотренных классов липопротеидов установлено, что средний состав белка является постоянным для каждого класса липопротеидов. Наибольшее сходство в аминокислотном составе апопротеидов обнаруживают β - и пре- β -липопротеиды, а наименьшее — α - и β -липопротеиды. В составе различных классов липопротеидов обнаружены все аминокислоты, найденные в белках плазмы крови (γ -глобулин, фибриноген, трансферрин и др.).

Вопросы молекулярной организации липопротеидов плазмы (тип связи между липидными и белковыми молекулами, пространственное расположение их и состояние белка в комплексе) еще окончательно не решены. Полагают, что основной вклад в стабилизацию комплексов принадлежит силам слабого взаимодействия, роль ковалентных связей незначительна [301]. Среди сил слабого взаимодействия основное место отводится силам ван-дер-Ваальса, возникающим между гидрофобными областями липидов и неполярными боковыми цепями аминокислот, входящих в состав полипептидных цепей [16, с. 250].

В образовании липопротеидных структур участвуют и силы ионного взаимодействия между заряженными группами липидов [PO_4^- , PO_4^{2-} , NH_3^+ , $\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$, COO^-] и аминокислотных остатков полипептидных цепей (COO^- , NH_3^+) [14, р. 95], например:



Бивалентные катионы, такие, как Ca^{2+} и Mg^{2+} , могут служить в качестве мостиковой связи между анионной группой липида и анионной группой белка:



Кроме того, между отдельными атомами белковых и липидных молекул (O, N, H) могут возникать водородные связи. Некоторая роль в стабилизации структуры липопротеидов отводится воде, однако вклад ее вряд ли значителен, так как количество воды в липопротеиде не превышает 0,1 г/г липидов, что даже меньше, чем для свободных белков плазмы.

Многие типы липопротеидов содержат слишком большое количество липидов для того, чтобы обеспечить непосредственное связывание всех неполярных областей липидных остатков с неполярными областями белка. В подобных случаях структура липопротеидов должна включать также липид-липидное взаимодействие [14].

По-видимому, можно представить два экстремальных типа липопротеидов. В одном случае в молекуле липопротеида каждая молекула липида специфически связана с комплементарной белковой структурой, в другом — молекула липопротеида включает липидные агрегаты (липид-липидное взаимодействие); которые также взаимодействуют с белковыми молекулами. Между этими двумя крайними типами имеются промежуточные состояния.

Исследование липопротеидных частиц плазмы крови с помощью электронного микроскопа показало, что они представляют собой сферические частицы различного диаметра.

По наиболее распространенному представлению о молекулярной организации частицы хиломикрона предполагают, что внутри сферической частицы находятся триглицериды, а на поверхности в виде монослоя — фосфолипиды. Полярные головки молекул фосфолипидов обращены наружу, так что мицелла представляет собой гидрофильную частицу. В связи с малым содержанием белка (~2%) в хиломикронах он не может играть большой роли в образовании мицеллы. Предполагают, что пептидные цепи расположены на поверхности частицы. Об этом свидетельствуют растворимость липопротеидов в воде, возможность их титрования, электрофоретическая подвижность, сравнимая с подвижностью глобулинов, высокая склонность белков крови адсорбироваться на поверхности липидных частиц и т. д.

В липопротеидных частицах низкой плотности количество белка недостаточно для образования полного поверхностного слоя, и возможно, что на поверхности частиц наряду с белками имеются и фосфолипиды; внутренняя часть частиц образована нейтральными липидами. В липопротеидах высокой плотности количество белка достаточно для контакта со всеми липидными молекулами.

Вопрос о структуре белка в составе комплексов окончательно не решен. Предполагают, что белок β -липопротеидов имеет складчатую структуру, а белок липопротеидов высокой плотности — конфигурацию α -спирали [297]. Выделение из липопротеидов белка в нативном состоянии затруднено из-за легкости его денатурирования. Это навело на мысль о метастабильном состоянии белка в биоконплексах, что согласуется с термодинамическими соображениями, согласно которым процесс конплексообразования нарушает вторичную и третичную структуры белка.

Существенной чертой липопротеидных частиц плазмы, которая весьма важна для их функционирования, является склонность к обмену липидными компонентами между отдельными частицами.

МЕМБРАННЫЕ СТРУКТУРЫ

Мембраны выполняют центральную роль в организации и функционировании живой клетки. Они представляют собой поверхности раздела, которые отделяют клетку от окружающей среды (плазматические мембраны), а также делят клетку на отдельные части (клеточные мембраны).

Различают следующие типы клеточных мембран, которые присущи всем клеткам многоклеточных организмов: митохондриальные, ядерные, цитоплазматические, мембранные компоненты эндоплазматического ретикулула и других внутриклеточных органелл. Кроме того, в специализированных клетках присутствуют мембранные системы, которые имеют ряд особенностей, связанных со специфической функцией данной клетки.

Биологические мембраны выполняют важную роль в таких сложных биохимических процессах, как трансформация энергии, передача нервного импульса, транспорт веществ и ионов и т. д. [302]. В связи с этим биологические мембраны являются предметом всестороннего исследования [303, р. 67; 304, р. 1403; 305, р. 246]. Вопросы структуры и функционирования биологических мембран находятся в центре внимания биохимиков, биофизиков и физиологов. Решение этой проблемы возможно лишь в результате конплексных исследований. Большинство исследователей считает, что биологические мембраны следует рассматривать как высокополимерные крупные агрегаты, построенные из липопротеидов.

Химический состав мембран

Основными структурными элементами биологических мембран являются липиды и белки, полисахариды принадлежат к числу второстепенных компонентов [306]. Отдельные биологические мембраны характеризуются различным отношением белок : липид. Как правило, содержание липидов в мембранных препаратах составляет 20—40%, например в плазматических мембранах — 35—40%, в митохондриальных мембранах сердца млекопитающих — 27—29%. Необычно высоко содержание липидов в миелине (80% сухой массы) [307].

Основная часть липидов в биологических мембранах представлена фосфолипидами (от 90% в митохондриях до 50% в миелине). Каждый вид мембраны характеризуется определенным соотношением фосфолипида и белка и индивидуальным набором фосфолипидов, т. е. структура полярных головок фосфолипидов и гидрофобных участков специфична для каждого вида мембран.

Среди глицерофосфолипидов ряда мембран преобладает фосфатидил-холин (например, до 65% в микросомах), в миелине доминирует фосфатидилэтаноламин [308]. Фосфатидилсерин, фосфатидилинозит, полиглицерофосфатиды присутствуют в меньших количествах, кардиолипин характерен лишь для митохондриальных мембран. В миелине и плазматических мембранах присутствуют в значительных количествах сфинголипиды (сфингомиелины и цереброзиды). Наряду с липидами со сложной эфирной связью в мембранах обнаружены и липиды с простой эфирной связью. Так, в некоторых плазматических мембранах присутствуют плазмалогены (около 12%). Высокое содержание плазмалогенов ($\frac{2}{3}$ от суммарного количества фосфолипидов) отмечено в эритроцитах.

Липидный состав митохондрий, хлоропластов и бактериальных мембран различен. В ламеллах хлоропластов содержится до 50% липидов, из которых 40% составляют моно- и дигалактозилдиглицериды, остальное количество представлено хлорофиллом, фосфатидилглицерином и сульфолипидами [309].

Набор различных фосфолипидов в биологических мембранах, по-видимому, важен для структурной организации мембраны, поскольку это находит отражение в специфическом связывании с белками и безусловно оказывает влияние на функционирование мембраны.

Наряду с различным составом гидрофильной части липидов мембран наблюдается также большое разнообразие гидрофобных компонентов, т. е. углеводородных цепей остатков жирных кислот, спиртов, альдегидов. В составе липидов мембран идентифицировано свыше 200 жирных кислот, отличающихся длиной цепи, степенью ненасыщенности и разветвленностью. Установлены определенные закономерности в жирнокислотном составе отдельных типов мембран. Так, в митохондриальных и цитоплазматических мембранах преобладают полиненасыщенные кислоты, в миелиновых и плазматических мембранах — насыщенные и мононенасыщенные жирные кислоты [309].

По-видимому, для организации мембран необходим определенный баланс гидрофильных и гидрофобных компонентов. Изменения в структуре гидрофобных компонентов вероятно обеспечивают физическое состояние фосфолипидов, необходимое для протекания метаболических и диффузионных процессов.

В некоторых мембранах присутствуют значительные количества нейтральных липидов, которые непосредственно не участвуют в связывании с белком, но, располагаясь внутри фосфолипидных мицелл, вносят изменения в ее гидрофобную часть и тем самым косвенно воздействуют на характер связывания мицеллы с белком [310].

Составной частью мембран является также холестерин, содержание которого в различных типах мембран изменяется очень широко. Так, для миелина и, по-видимому, для плазматической мембраны характерно высокое содержание холестерина (молярное отношение фосфолипид : холестерин равно 1), а в митохондриях, эндоплазматической сети и, возможно, во всех цитоплазматических мембранах холестерина содержится мало. Содержание холестерина существенно сказывается на проницаемости мембран.

Белки мембран изучены в меньшей степени, чем липиды. Их условно делят на два типа: белки, обладающие каталитической активностью (ферментативные), и структурные белки, лишенные каталитической активности. Структурные белки составляют 45—50% всего количества белков мембранных систем, они представляют собой набор белков, отличаю-

щихся молекулярной массой и аминокислотным составом. Для структурного белка характерно присутствие аминокислот, содержащих неполярные боковые цепи, за счет которых обеспечивается взаимодействие с гидрофобными участками фосфолипидов. Роль структурного белка в функционировании биологических мембран окончательно не выяснена, по-видимому, он имеет значение для поддержания структуры мембраны и оказывает аллостерическое регулирующее влияние на ферментные системы, локализованные в биологических мембранах.

Молекулярная организация биологических мембран

В настоящее время систематизирован большой материал по морфологическим характеристикам биологических мембран, их свойствам и химическому составу. Однако вопрос о молекулярной организации биологических мембран окончательно не решен [311, р. 1—67].

Согласно одной концепции, мембрана рассматривается как система мономолекулярных слоев белка и липида (концепция слоистого строения мембран) [312, р. 3, 44], в соответствии с другой точкой зрения, мембрана построена из слоя повторяющихся субъединиц, представляющих собой надмолекулярные липопротеидные комплексы (концепция субъединиц) [313—316].

Гипотеза слоистого строения мембраны была предложена в 1935 г. Даниэлли и Доусоном на основе изучения клеточной проницаемости и данных электронномикроскопических исследований, а далее обоснована и развита Робертсоном, который предложил модель так называемой элементарной мембраны (рис. 25). В основе этой концепции лежит принцип одинаковой организации всех мембран.

Элементарная мембрана построена по типу «сэндвича» (белок — липид — белок). Сердцевину мембраны составляет бимолекулярный липидный слой, в котором молекулы липидов ориентированы перпендикулярно поверхности мембраны. Полярные головки липидных молекул направлены наружу, в сторону водной фазы, а гидрофобные остатки жирных кислот, спиртов, альдегидов обращены внутрь бимолекулярного слоя. Липидный слой с обеих сторон прикрыт непрерывными мономолекулярными слоями белков (в меньшей степени, полисахаридов). Белки, входящие в состав мембраны, находятся в растянутой по поверхности липида форме и имеют β -конформацию. Белок по обеим сторонам мембраны может быть не одинаков, что определяет ее асимметричность. Мембрана стабилизирована за счет взаимодействия ионных групп липидов и белков.

В течение длительного времени такое представление о структуре мембраны имело широкое распространение и согласовывалось с искусственными модельными системами, которые прочно вошли в практику исследования клеточных мембран. Однако в последние годы в связи с развитием и дальнейшим совершенствованием методов выделения и иссле-

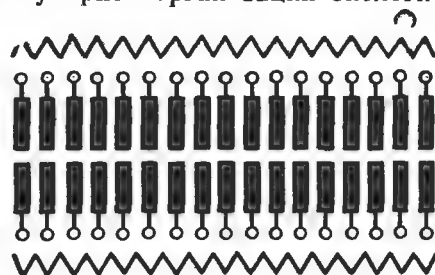


Рис. 25. Схема строения элементарной мембраны.

дования мембран (электронная микроскопия, различные виды спектроскопии, методы фрагментации и сборки мембран, изучение модельных мембранных систем и т. д.) накопились экспериментальные факты, которые не могли быть объяснены с позиций элементарной мембраны. Так, слоистое-расположение белков и липидов трудно согласуется с данными о слабой атакуемости мембран протеолитическими ферментами. Например, белки мембраны бактерий *Micrococcus lysodeikticus* очень медленно гидролизуются субтилопептидазой А, и в то же время мембрана сравнительно быстро разрушается под действием панкреатической липазы или фосфолипазы А. Это позволяет высказать предположение о расположении липидов на поверхности мембраны.

Исследование оптических свойств изолированных мембран в поляризованном и инфракрасном свете, а также с помощью ядерного магнитного резонанса показало, что значительная часть мембранных белков (до 50%) имеет конформацию α -спирали, а остальные белки находятся в состоянии случайных клубков, что противоречит модели Даниэлла —

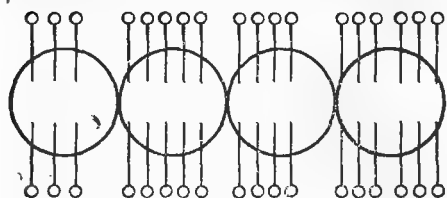


Рис. 26. Модель мембраны хлоропласта (по Бенсону).

Доусона. Кроме того, было установлено [317, р. 190—202], что участки белков с α -спиралью содержат большое количество «гидрофобных» аминокислот и находятся в гидрофобном окружении, что создает предпосылки для возникновения гидрофобных взаимодействий и ограничивает участие ионных сил, которым отводилась основная роль в модели элементарной мембраны.

О неравномерности распределения белков и липидов в мембране свидетельствует факт наличия участков липидов, отличающихся степенью прочности связи с белком.

Концепция слоистой элементарной мембраны подвергалась критике со стороны ряда исследователей, которые считали целесообразным рассматривать мембрану как совокупность повторяющихся субъединиц [313—316]. Субъединицы, по их мнению, следует классифицировать как надмолекулярные липопротеидные комплексы, в которых роль структурного каркаса принадлежит белкам. Липопротеидные комплексы стабилизированы главным образом за счет гидрофобных взаимодействий [318].

Сторонниками концепции субъединиц выдвинут ряд гипотез строения мембран. По мнению Бенсона мембрана построена из однородной липопротеидной массы [317]. Так, в мембране хлоропласта внутренняя часть образована гидрофобными группами белка, имеющими α -спиральную конформацию, гидрофильные группы белка ориентированы на поверхности белковой молекулы. Липиды образуют несплошной бимолекулярный слой, прерываемый участками белка (рис. 26). Гидрофобные части молекул липидов расположены в белке, а полярные головки обращены в водную фазу.

Значительно большее признание получила гипотеза глобулярного строения мембраны [313], согласно которой мембрана построена из цепочки глобул, представляющих собой мицеллы липида; белки в предполагаемой схеме скрепляют глобулы липидов. По схеме, предложенной Фрей-Висслингом и Мюлеталером [315], мембрана построена из двух слоев липопротеидных субъединиц, в отдельных местах между которы-

ми внедряются более крупные белковые частицы, проявляющие свойства ферментов (рис. 27).

Гипотеза глобулярности биологических мембран получила некоторое обоснование в исследованиях Грина [314]. Согласно предложенной им схеме, мембрана построена из повторяющихся субъединиц, отличающихся между собой набором ферментов. Фосфолипиды, взаимодействуя с глобулярными субъединицами мономолекулярного белкового слоя, как бы пропитывают его поверхность.

Кроме того, выдвинут ряд схем строения мембраны, которые занимают промежуточное положение между концепцией слоистого строения и концепцией субъединиц. По модели Луси, мембрана на одних участках включает сферические липидные мицеллы, расположенные в гексагональном порядке, на других — бимолекулярный слой липидов. В некоторых местах вместо мицелл присутствуют глобулярные белковые молекулы. Липидные мицеллы и бимолекулярные слои покрыты сплошным слоем неглобулярного белка или гликопротеида.

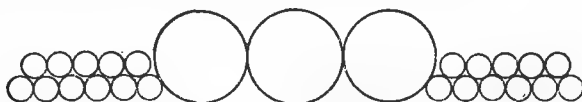


Рис. 27. Модель мембраны (по Фрей-Висслингу и Мюлеталеру).

В настоящее время отдать предпочтение какой-либо из описанных концепций строения биологической мембраны (концепции слоистого строения или строения из субъединиц) не представляется возможным.

Для изучения биологических мембран применяют разнообразные физико-химические методы: ИК- и раман-спектроскопию, ЯМР, оптические методы (ДОВ и циркулярный дихроизм), рентгеноструктурный анализ. Определенная информация о структуре и функционировании биологических мембран может быть получена также из изучения искусственных мембранных систем.

Намечены различные подходы к изучению мембран. Одна группа методов основана на фрагментации мембран на определенные морфологические, химические и биохимические компоненты, изучении их свойств и последующей рекомбинации мембранной структуры [318, 319].

Фрагментацию мембран осуществляют различными способами: воздействием ультразвука, изменением ионной силы и солевого состава среды, механическим разрушением, действием ферментов (протеазы, липазы, фосфолипазы), химических агентов (мочевина, соли желчных кислот и т. д.), обработкой различными детергентами (анионо- и катионоактивные, неионогенные).

Механизм взаимодействия детергентов с биологическими мембранами неизвестен. Вопрос о том, являются ли фрагменты мембран липопротеидными комплексами или же образуют смесь липиднодетергентных и белководетергентных комплексов, окончательно не решен.

Реконструкция мембран из фрагментов достигается удалением детергента диализом или уменьшением его концентрации. Реконструированная мембрана обычно отличается от исходной по составу и активности присутствующих в ней ферментов, что может быть обусловлено конформационными изменениями, вызванными детергентами или иным взаимным положением липидов и мембранных ферментов.

Метод фрагментации детергентами имеет ряд ограничений и единственный надежный вывод, который можно сделать на основании сопоставления результатов различных работ, состоит в том, что несомненно большая роль в сцеплении компонентов биологических мембран принадлежит гидрофобным взаимодействиям, хотя существенное значение имеют и электростатические силы. В каждом конкретном виде биологических мембран соотношение этих сил должно быть различным в зависимости от природы белков, состава липидов и характера других компонентов, например полисахаридов.

Одним из действенных методов исследования биологических мембран является электронная микроскопия, на данных которой главным образом и основана концепция слоистого строения мембраны. Однако к интерпретации результатов электронномикроскопических исследований подходят с определенной осторожностью, учитывая возможность изменения мембранного материала в процессе его подготовки к исследованию.

В последние годы предложены новые методы подготовки мембранного материала, которые исключают возможность структурных изменений. Среди них наиболее известен метод замораживания — травления, сущность которого состоит в том, что мембранный материал предварительно импрегнируют антифризом (изотонический водный раствор глицерина) и замораживают в вакууме. Затем под вакуумом делается срез (скол) материала и с обнаженной поверхности приготавливается реплика, которую и исследуют. Этот метод создает возможность изучения мембран в их естественном водном окружении. Пропитка антифризом и быстрое замораживание ткани предотвращают образование льда и связанных с ним нарушений. В настоящее время с помощью этого метода изучено строение мембран различного типа, однако данные, полученные различными исследователями, интерпретируются неоднозначно.

Реплики поперечного среза мембран имели типичное трехслойное строение, причем на поверхности мембран были обнаружены сферические частицы (размер 6,0—25,0 нм). Предполагают, что частицы представляют собой липопротеидные субъединицы и располагаются внутри мембраны. Однако это маловероятно, поскольку частицы не выявляются на поперечных срезах мембран, где отчетливо просматривается трехслойная структура с гомогенным средним слоем. По мнению других исследователей, частицы представляют собой наружный белковый компонент мембраны, однако неясно, почему они не выявляются в некоторых мембранах. Возможно, частицы следует рассматривать как комплексы глобулярных белков-ферментов, адсорбированные мембраной или частично пронизывающие ее.

Следовательно, и метод замораживания — травления пока не доказывает существования субъединиц в мембранах и в большей степени согласуется с концепцией слоистой структуры мембраны.

Данные по биогенезу мембран также не подтверждают концепцию строения мембраны из субъединиц. В этом случае сборка мембраны должна была бы быть одноэтапным процессом, в то время как в действительности сборка мембраны происходит в несколько этапов: вначале создается липидная основа мембраны, а далее присоединяется белковый компонент.

Данные электронной микроскопии, рентгеноструктурного анализа, биофизических исследований, а также данные по химическому составу мембран в большей степени согласуются с концепцией слоистой мембраны.

Сторонники слоистого строения мембраны допускают ряд модификаций элементарной мембраны, в частности возможность гидрофобного взаимодействия между белками и липидами, а также возможность проникновения белка в бимолекулярный липидный слой и т. д.

Таким образом, интересный и важный вопрос о строении биологических мембран — одного из главных элементов живой клетки — до сих пор окончательно не решен, хотя, по-видимому, не вызывает сомнения тот факт, что все мембраны имеют один и тот же основной принцип организации.

ПРОТЕОЛИПИДЫ

Термин протеолипиды впервые применен для обозначения определенной липидной фракции белого вещества головного мозга, которая наряду с липидами содержала белок и была растворима в смеси хлороформ — метанол (1:1).

Протеолипиды обнаружены в различных тканях животного организма (мозг, сердце, почки, легкие, скелетные мышцы), крови, в растениях (хлоропласты салата), в водорослях, микроорганизмах, молоке. Протеолипиды являются основными компонентами мембранных органелл и миелина. Они локализованы в ядерных и плазматических мембранах, в митохондриях, в микросомальных фракциях.

В растительном материале протеолипиды представлены в хлоропластах. Для выделения их используют различные методы осаждения, диализ, хроматографию на сефадексах, электрофорез, ионообменную хроматографию и др.

Содержание белка в протеолипидах колеблется от 65 до 86%. В настоящее время изучен аминокислотный состав ряда протеолипидов и отмечено его сходство с аминокислотным составом структурных белков соответствующих органов. Для протеолипидов мозга характерно высокое содержание триптофана.

Протеолипиды, выделенные из различных источников, имеют разный липидный состав. Так, протеолипид белого вещества головного мозга включает в качестве липидной половины в основном цереброзиды. Из сердца выделен протеолипид с геминоподобным белком, содержащим железо. Липидная часть этого гематопротеолипида представлена смесью лецитина, фосфатидилэтаноламина, фосфатидилсерина, инозитфосфатидов, сфингомиелинов, полиглицерофосфолипидов, плазмалогенов. Количество нейтральных липидов очень мало; молярное отношение нейтральный липид : фосфолипид составляет 1 : 30. Протеолипид хлоропласта салата содержит галактолипид, сульфат галактозилдиглицерида.

Протеолипиды расщепляются при действии ряда растворителей, вызывающих денатурацию, при добавлении солей органических и неорганических кислот, щелочных значениях pH, увеличении ионной силы раствора и т. д.

Предполагают, что в протеолипидах имеется белковое ядро, покрытое слоем липидов, молекулы которых связаны друг с другом и с белком нековалентными связями. В пользу подобной молекулярной организации протеолипидов свидетельствуют такие факты, как резистентность к действию протеаз, нерастворимость в воде, некоторые гистохимические исследования и т. д.

К оценке биологической роли липидов, особенно полярных липидов (фосфолипиды, сфинголипиды, гликолипиды), в последнее время подходят с позиций их участия в построении и функционировании клеточных мембран.

Полярные липиды рассматривают как динамические компоненты мембран, которые подвергаются процессам катаболизма и биосинтеза. Тонкая сбалансированность этих реакций обеспечивает замечательное постоянство и стабильность организации мембран [320].

С участием мембран и присутствующих в них липидов осуществляется ряд важнейших биохимических клеточных процессов, обеспечивающих жизнедеятельность организма: транспортные, энергетические процессы и другие. Так, полагают, что мембранные липиды принимают участие в транспортировке ионов и различных молекул через стенки клетки и субклеточных частиц [321].

Различают несколько типов переноса ионов и молекул через мембрану.

1) «Пассивная» диффузия, направление и скорость которой определяются градиентом концентрации между внутриклеточной и внешней средой.

2) Катализируемая диффузия через клеточную мембрану, т. е. диффузия с участием определенных катализаторов белковой природы, играющих роль посредников при проникновении в клетку некоторых соединений.

3) Активный перенос через клеточную мембрану, т. е. перенос, сопровождающийся затратой энергии и осуществляемый против градиента концентрации.

Отсутствие достоверных данных о молекулярной организации биологических мембран не позволяет однозначно определить механизм транспортных процессов, однако участие в них липидов не вызывает сомнения.

Наиболее интенсивно изучается активный перенос ионов Na^+ и K^+ через плазматическую мембрану [302]. Сущность этого явления состоит в том, что внутриклеточная жидкость имеет высокое содержание ионов K^+ и низкое содержание ионов Na^+ , во внеклеточной среде, наоборот, выше содержание ионов Na^+ . Для поддержания указанных градиентов концентраций моновалентных катионов и, особенно, для их восстановления после деполяризации мембраны обязательно должно происходить удаление из клетки ионов Na^+ и активное всасывание в клетку ионов K^+ . Эта система транспорта, сосредоточенная в плазматической мембране, называется «натриевым насосом». Энергия, необходимая для активного транспорта ионов Na^+ против градиента концентрации, обеспечивается расщеплением АТФ (до АДФ и неорганического фосфата). Подобный распад АТФ катализируется ферментом — $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -активированной АТФ-азой.

Для объяснения механизма транспорта ионов Na^+ и K^+ предложено несколько теорий. Согласно одной из них [329], перенос этих ионов осуществляется с помощью молекул-переносчиков, функцию которых могут выполнять определенные типы фосфолипидов (фосфатидовая кислота, фосфатидилсерин, ди- и трифосфоинозитиды) или фосфопротеиды. Другая модель активного переноса основана на существовании в мембране пор, внутри которых находятся макромолекулы, обладающие определенными центрами для связывания ионов Na^+ и K^+ . Предполагают, что в

ходе транспортного процесса с помощью АТФ изменяется распределение электронной плотности в макромолекуле, следствием чего является изменение ее конформации и сродства к ионам Na^+ и K^+ , что вызывает их перенос в том или ином направлении. Ни одна из этих теорий не имеет общего признания.

Ряд экспериментальных данных строго подтверждает необходимость фосфолипидов для осуществления активного транспорта моновалентных катионов через мембрану. Исследования, выполненные на искусственных и природных мембранах, показали, что проницаемость биологических мембран для ионов и молекул в значительной мере определяется составом липидов и структурой их гидрофобных и гидрофильных компонентов. Барьерные свойства мембран зависят от природы углеводородной цепи фосфолипидов, взаимодействия фосфолипида и холестерина и химической природы полярных головок фосфолипидов. С уменьшением длины цепи жирнокислотных остатков фосфолипидов или увеличением степени их ненасыщенности увеличивается подвижность цепей, что в свою очередь повышает скорость диффузионных процессов, а также транспорт молекул-переносчиков. При взаимодействии фосфолипидов с холестерином уменьшается площадь фосфолипидов и, следовательно, их проницаемость. Природа полярных головок также влияет на проницаемость биологических мембран. Эффект ионной проницаемости зависит от заряда фосфолипида. Например, в грамположительных бактериях фосфатидилглицерин (заряжен отрицательно) селективно пропускает катионы и протоны, а лизилфосфатидилглицерин (заряжен положительно) — анионы.

От мембран неотделимы сложные системы ферментативных реакций. Ферменты, катализирующие эти реакции, локализованы в мембранах и для функционирования многих из них необходимы липиды. Так, внутренние мембраны митохондрий содержат ферменты, включающиеся в цепь транспорта электронов и сопряженное с ней окислительное фосфорилирование.

Многие ферментные комплексы цепи транспорта электронов в митохондриях могут быть выделены в виде дискретных липопротеидов, в состав которых включаются фосфолипиды [323]. Удаление фосфолипидов из этих липопротеидов сопровождается потерей ферментативной активности. Добавление очищенных фосфолипидов и убихинона восстанавливает активность. Степень реактивации в каждом случае пропорциональна количеству фосфолипидов, связанных в митохондриях.

Причины включения фосфолипидов в качестве одного из основных компонентов в подобные ферментные комплексы неизвестны. Полагают, что они могут способствовать определенной ориентации индивидуальных ферментов активными центрами друг к другу, благодаря чему создаются условия для проявления их максимальной активности. Кроме того, среди белков цепи переноса электронов могут присутствовать водорастворимые и водонерастворимые белки, которые при помощи фосфолипидов могут соединяться в единую функциональную систему. Фосфолипиды могут создавать неводную фазу в определенных участках клеточной среды. Считают [323], что процесс окислительного фосфорилирования в митохондриях протекает в безводном липидном матриксе и что фосфолипиды необходимы для создания среды с низкой диэлектрической постоянной.

Фосфолипиды необходимы для функциональной активности и ряда ферментов. Например, α, β -диглицерид-дифосфохолинтрансфераза, лока-

лизированная как на внешней, так и на внутренней мембранах митохондрий, активируется в присутствии фосфолипидов. Фосфолипиды необходимы для активности ферментной системы, связанной с сокращением актомиозиноподобного белка митохондрий; дегидрогеназа β -оксимасляной кислоты может взаимодействовать с НАД только в присутствии лецитина и т. д.

Полной ясности о значении фосфолипидов для функционирования ферментных систем, которые с ними связаны, до сих пор нет. Однако для этого безусловно важны такие свойства фосфолипидов, как способность образовывать мицеллы и сочетание гидрофобных и гидрофильных компонентов в их молекулах.

Фосфолипиды вовлекаются в ферментные реакции, приводящие к биосинтезу макромолекулярных компонентов бактериальных клеток (липополисахаридов).

Значение фосфолипидов как субстратов, поставляющих энергию, не столь значительно; здесь главную роль играют нейтральные липиды, которые являются одним из наиболее важных энергетических источников организма.

Предполагают, что фосфолипиды выполняют определенную роль в механизме передачи нервного импульса [324], в биосинтезе белка; высказан ряд предположений об участии их в функционировании головного мозга, зрительном акте и т. д.

Многочисленные исследования посвящены вопросам метаболизма липидов в норме и патологии в различных тканях [296, 297, 325].

Значительное внимание уделяется изучению обмена липопротеидов, поскольку с нарушением его связано заболевание атеросклерозом [325]. По-видимому, первичным субстратом, вызывающим атеросклеротические поражения сосудов, служат атерогенные липопротеиды (β - и пре- β -липопротеиды), уровень их в крови является главной причиной в развитии атеросклероза. В свою очередь содержание β - и пре- β -липопротеидов в крови зависит от влияния многих факторов — генетических, гормональных, эмоциональных, возрастных и т. д.

Установлено, что липиды нормальных тканей и опухолей не отличаются по качественному составу, т. е. не существует липидов, специфичных для опухоли, как полагали ранее. Однако отмечено существенное различие во внутриклеточном распределении фосфолипидов в опухолевых и нормальных тканях. В субклеточных фракциях опухолей нарушается специфическое распределение фосфолипидов, характерное для нормальных тканей; их состав выравнивается и становится близким к фосфолипидному составу клетки в целом, т. е. происходит дедифференцировка мембран. Причиной ее, по-видимому, является нарушение биосинтеза липидов и, возможно, связанные с ним изменения скоростей обмена отдельными фосфолипидами между мембранными структурами. Кроме того, наблюдается появление фосфолипидов с необычным распределением жирных кислот. Со структурой биологических мембран и, следовательно, косвенно с присутствующими в них липидами связывают действие анестетиков, лекарственных препаратов. Однако неизвестно, выполняют ли липиды при этом пассивную или активную роль.

Фосфолипиды влияют на процессы кроветворения, способствуют фагоцитозу лейкоцитов и регулируют действие гемолитических ядов, влияют на работу сердечной мышцы и т. д.

Концентраты фосфолипидов применяют в медицинской практике для лечения атеросклероза, в качестве общетонизирующего средства. Липиды используют в пищевой промышленности в качестве антиоксидантов и эмульгаторов, в кондитерском производстве, в косметике, животноводстве и т. д.

Липиды выполняют многообразные функции в жизнедеятельности организма и роль их, по-видимому, более значительна, чем предполагали ранее.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Kuksis A.*, "Progress in the chemistry of fats and other lipids", 1972, v. 12, p. 16—54.
2. *Wood R., Snyder F.*, J. Am. Oil Chem. Soc., 1967, v. 44, № 7, p. 381—393.
3. *Шеллард Э.* Количественная хроматография на бумаге и в тонком слое. Пер. с англ. Под ред. А. Н. Ермаковой. М., «Мир», 1971. 192 с.

4. Kuksis A., Marat L., "Lipids", 1967, v. 2, № 3, p. 217—224.
5. Lipid Chromatographic Analyses. Ed. G. V. Marinetti, London — New York, Dekker, 1967, v. 1, 537 p.; 1969, v. 2, 596 p.
6. Wood R. e. a., J. Lipid Res., 1969, v. 10, p. 128—131; "Lipids", 1966, v. 1, № 1, p. 66—72.
7. Rouser G. e. a. In: "Methods in Enzymology", v. 14. Ed. S. P. Colowick, N. O. Kaplan, N. Y., Acad. Press, 1969. 771 p.
8. Deuel Z. J. The Lipids. V. 1, L., Acad. Press, 1951. 350 p.
9. Szeląg H., "Progress in the chemistry of fats and other lipids", 1954, v. 2, p. 243—265.
10. Privett O. S., "Progress in the chemistry of fats and other lipids", 1968, v. 9, pt. 3, p. 409—436.
11. Holman R. T., Rahm J. J., "Progress in the chemistry of fats and other lipids", 1966, v. 9, pt. 1, p. 1—92.
12. Шталь Э. Хроматография в тонких слоях. Пер. с нем. Под ред. К. В. Чмутова. М., «Мир», 1965. 508 с.
13. Ackman R. G., "Progress in the chemistry of fats and other lipids", 1972, v. 12, p. 165—285.
14. Chapman D. Introduction to Lipids. London, McCraw-Hill, 1969. 141 p.
15. Deenen L. L. M., "Progress in the chemistry of fats and other lipids", 1965, v. 8, pt. 1, p. 1—113.
16. Финейн Дж. Биологические ультраструктуры. Пер. с англ. Под ред. Л. Д. Бергельсона. М., «Мир», 1970. 325 с.
17. Fatty Acids. The chemistry, properties, production and uses. 2-d ed. Pt. 1—5, Ed. K. S. Markley, New York — London, Interscience publishers, 1960—1968, pt. 1, 1960, 714 p.; pt. 2, 1961, 715—1485 p.; pt. 3, 1964, 1485—2479 p.; pt. 4, 1967, 2481—3118 p.; pt. 5, 1968, 3119—3835 p.
18. Gaines G. L. Insoluble monolayers at liquid-gas interfaces. N. Y., Interscience Publ., 1966. 386 p.
19. Masoro E. J. Physiological Chemistry of Lipids in Mammals. Philadelphia — London — Toronto, W. B. Saunders Company, 1968. 304 p.
20. Privett O. S. "Progress in the chemistry of fats and other lipids", 1966, v. 9, pt. 1, p. 94—115.
21. Полякова А. А., Хмельницкий Р. А. Масс-спектры в органической химии. Л., «Химия», 1972. 368 с.
22. Hopkins C. V. "Progress in the chemistry of fats and other lipids", 1965, v. 8, pt. 2, p. 114—170.
23. Hilditch T. P., Williams P. N. The chemical constitution of natural fats. 4-th ed. Ed. H. Chapman. London, 1964. 745 p.
24. Митрофанова Т. К. и др., ДАН СССР, 1965, т. 160, № 1, с. 133—136.
25. Gensler W. J., Chem. Rev., 1957, v. 57, № 2, p. 191—280.
26. Краевский А. А., Требожанов А. Д., Ж. орг. хим., 1967, т. 3, с. 441—444.
27. Osbond J. M., Wickens J. C., J. Chem. Soc., 1961, № 10, p. 2779—2784; Rachlin A. J., Wasolin N., Goldberg M. W., J. Org. Chem., 1961, v. 26, № 9, p. 2688—2693.
28. Van der Steen D., Pabon H. J. J., van Dorp A., Rec. trav. chim., 1963, v. 82, № 10, p. 1015—1025; 1965, v. 84, № 10, p. 1319—1326; Nature, 1964, v. 203, № 4947, p. 839—841.
29. Marcel V., Holman R. T., Chem. Phys. Lipids, 1968, v. 2, № 2, p. 173—177.
30. Gensler W. J., Bruno J., J. Org. Chem., 1963, v. 28, № 5, p. 1254—1259.
31. Краевский А. А., Пятнова Ю. Б., ДАН СССР, 1962, т. 146, № 6, с. 1349—1351; Gensler W. J., Thomas G. R., J. Am. Chem. Soc., 1951, v. 73, № 10, p. 4601—4604.
32. Klenk E., Mohrhauer H., Z. physiol. Chem., 1960, Bd. 320, № 5, S. 218—232.
33. Краевский А. А., Сарычева И. К., Преображенский Н. А., ЖОХ, 1963, т. 32, № 6, с. 1831—1835; Ж. орг. хим., 1965, т. 1, № 1, с. 44—46.
34. Краевский А. А., Преображенский Н. А., ЖОХ, 1965, т. 35, № 4, с. 618—621.
35. Osbond J. M., "Progress in the chemistry of fats and other lipids", 1966, v. 9, pt. 1, p. 121—154.
36. Краевский А. А. и др., ЖОХ, 1962, т. 32, № 11, с. 3541—3543.
37. Baker C. D., Gunstone F. D., J. Chem. Soc., 1963, № 1, p. 489—501.
38. Williams M. C., Reiser R., J. Am. Oil Chem. Soc., 1963, v. 40, № 6, p. 237—241.
39. Raquet C., Bull. Soc. chim. France, 1964, № 8, p. 1673—1679.
40. Яновская Л. А., «Успехи химии», 1961, т. 30, № 7, с. 813—845.
41. Bergelson L. D., Schemjakin M. M., Angew. Chem., 1964, Bd. 76, № 3, S. 113—129.
42. Вавер В. А., Дорогов В. В., Бергельсон Л. Д., Изв. АН СССР, 1966, № 12, с. 2241—2242.

43. Snyder F., "Progress in the chemistry of fats and other lipids", 1969, v. 10, pt. 3, p. 289—335.
44. Sun G. V., Horrocks L. A., J. Lipid Res., 1969, v. 10, № 2, p. 153—157.
45. Bentley R. Molecular Asymmetry in Biology. V. 1. New York—London, Acad. Press, 1969. 322 p.; Иллис Э. Основы стереохимии. Пер. с англ. Под ред. В. М. Потапова. М., «Мир», 1971. 107 с.
46. Верещагин А. Г. Биохимия триглицеридов. Под ред. Л. Д. Бергельсона. М., «Наука», 1972. 306 с.
47. Chem. Phys. Lipids, 1968, v. 2, № 2, p. 156—160.
48. Hirschmann H., J. Biol. Chem., 1960, v. 235, № 10, p. 2762—2767.
49. Hilditch T. P., Williams P. N. The Chemical Constitution of Natural Fats. 4-th ed. Ed. H. Chapman, London, 1964. 745 p.
50. Wills E. D. In: "Adv. in Lipid Research", v. 3. New York—London, Acad. Press, 1965. 263 p.
51. Slakey P. M., Lands W. E. M., "Lipids", 1968, v. 3, № 2, p. 30—36; J. Lipid Res., 1967, v. 8, № 2, p. 167—173.
52. Равич Г. Б., Цуринов Г. Г. Фазовая структура триглицеридов. М., Изд. АН СССР, 1952. 140 с.
53. Malkin T., "Progress in the chemistry of fats and other lipids", 1954, v. 2, p. 150—190.
54. Van Lohuizen O. E., Verkade P. E., Rec. trav. chim., 1960, v. 79, № 1, p. 133—138.
55. Malkin T., Bevan T. H., "Progress in the chemistry of fats and other lipids", 1957, v. 4, p. 64—90.
56. Mattson F. H., Volpenheim R. A., J. Lipid Res., 1962, v. 3, № 3, p. 281—296.
57. Serdarevich B., J. Am. Oil Chem. Soc., 1967, v. 44, № 7, p. 381—393.
58. Buchnea D., Chem. Phys. Lipids, 1967, v. 1, № 2, p. 113—127; № 2, p. 128—142; № 3, p. 177—182; 240—255.
59. Selinger Z., Lapidot V., J. Lipid Res., 1966, v. 7, № 1, p. 174—175.
60. Thompson J. E., J. Org. Chem., 1965, v. 30, № 12, p. 4276—4280.
61. Wolfrom M. L., Adv. in Carbohydrate Chem., 1961, v. 16, p. 207—238.
62. Brochere G., Ferreol G., Polonsky J., Bull. Soc. chim. France, 1958, № 5, p. 714—717.
63. Титов В. И. и др., Ж. орг. хим., т. 6, № 12, с. 2412—2417.
64. Браун О. М. В кн.: «Успехи органической химии». Т. 3. Пер. с англ. Под ред. И. Л. Кнунянца. М., «Мир», 1966. 299 с.
65. Baer E., Fischer H. O. L., J. Biol. Chem., 1939, v. 128, № 1, p. 463—468.
66. Hartman L., J. Chem. Soc., 1959, № 12, p. 4134—4135.
67. Barry P. E., Craig B. M., Can. J. Chem., 1955, v. 33, № 4, p. 716—721; Krabisch L., Borgström B., J. Lipid Res., 1965, v. 6, № 1, p. 156—157.
68. Gigg J., Gigg R., J. Chem. Soc. (C), 1966, № 4, p. 431—435.
69. Porck A. E., Craig B. M., Can. J. Chem., 1955, v. 33, № 8, p. 1286—1289.
70. Baer R., Buchnea D., J. Biol. Chem., 1958, v. 230, № 1, p. 447—456.
71. Lands W. E. M., Zschocke A., J. Lipid Res., 1965, v. 6, № 2, p. 324—325.
72. Gigg J., Gigg R., J. Chem. Soc. (C), 1967, № 19, p. 1865—66.
73. Молотковский Ю. Г., Никулина Л. Ф., Бергельсон Л. Д., Изв. АН СССР. Сер. хим., 1967, № 4, с. 927—929.
74. Pfeiffer F. R., Miao C. K., Weisbach J. A., J. Org. Chem., 1970, v. 35, № 1, p. 221—224.
75. Gunningham J., Gigg R., J. Chem. Soc., 1965, № 2, p. 1553—1554.
76. Федорова Г. Н., Серебренникова Г. А., Евстигнеева Р. П., Ж. орг. хим., 1971, т. 7, № 5, с. 957—962.
77. Желвакова Э. Г., Магнашевский В. А., Ермакова Л. И., Ж. орг. хим., 1970, т. 6, № 10, с. 1987—1992.
78. Gigg J., Gigg R., J. Chem. Soc. (C), 1968, № 1, p. 16—21.
79. Hartman L., Chem. Rev., 1958, v. 58, p. 845—867.
80. Серебренникова Г. А. и др., ЖОХ, 1961, т. 31, № 5, с. 1537—1540; № 9, с. 2984—2986; № 7, с. 2178—2180.
81. Bentley P. H., McCrawe W., J. Org. Chem., 1970, т. 35, № 6, с. 2082—2084.
82. Chacko G. K., Hanahan D. J., Biochim. Biophys. Acta, 1968, v. 164, № 2, p. 252—271.
83. Серебренникова Г. А. и др., ДАН СССР, 1961, т. 140, № 5, с. 1083—1086.
84. Митрофанова Т. К. и др., ДАН СССР, 1965, т. 160, № 1, с. 133—136.
85. Snyder F., "Progress in the chemistry of fats and other lipids", 1969, v. 10, pt. 3, p. 289—335.

86. *Mallins D. C., Wekell J. C.*, "Progress in the chemistry of fats and other lipids", 1969, v. 10, pt. 4, p. 336—362.
87. *Hallgren B., Stållberg G.*, Acta Chem. Scand., 1967, v. 21, № 6, p. 1519—1529.
88. *Kates M., Palameta B., Vengoyan L. S.*, "Biochemistry", 1965, v. 4, № 8, p. 1595—1599; J. Lipid Res., 1968, v. 9, p. 782—788.
89. *Serdarevich B., Carroll K. K.*, Can. J. Biochem., 1966, v. 44, № 6, p. 743—747.
90. *Baumann W. J., Mangold H. K.*, Biochim. Biophys. Acta, 1966, v. 116, № 3, p. 570—576; *Звоноква Е. Н.* и др., Ж. орг. хим., 1965, т. 1, № 4, с. 630—634.
91. *Palameta B., Kates M.*, Biochemistry, 1966, v. 5, № 2, p. 618—625; *Thomas P. J., Law J. H.*, J. Lipid Res., 1966, v. 7, № 3, p. 453—455.
92. *Thiele O. W.*, Z. klin. Chem., 1964, Bd. 2, № 1, S. 33—60.
93. *Rapport M. M., Norton W. T.*, Ann. Rev. Biochem., 1962, v. 31, № 1, p. 109—135.
94. *Klenk E., Debuch H.*, "Progress in the chemistry of fats and other lipids", 1963, v. 6, p. 3—29.
95. *Warner H. R., Lands W. E.*, J. Am. Chem. Soc., 1963, v. 85, № 1, p. 60—64; *Norton W. T., Gottfried E. L., Rapport M. M.*, J. Lipid Res., 1962, v. 3, № 4, p. 456—459; *Ansell G. B., Spanner S.*, Biochem. J., 1965, v. 97, № 2, p. 375—379.
96. *Craig J. C., Hamon D. P. G.*, J. Org. Chem., 1965, v. 30, № 12, p. 4168—4175; *Slotboom A. J., De Haas G. H., Van Deenen L. L. M.*, Chem. Phys. Lipids, 1967, v. 1, № 3, p. 192—195.
97. *Schmid H. H. O., Baumann W. J., Mangold H. K.*, Biochim. Biophys. Acta, 1967, v. 144, № 2, p. 344—354.
98. *Piantadosi C. e. a.*, J. Org. Chem., 1963, v. 28, № 9, p. 2425—2429; *Craig J. C. e. a.*, J. Org. Chem., 1965, v. 30, № 3, p. 907—910.
99. *Craig J. C., Hamon D. P. G.*, Chem. Ind., 1965, № 36, p. 1559—1560.
100. *Gigg J., Gigg R.*, J. Chem. Soc. (C), 1968, № 16, p. 2030—2032.
101. *Парфенов Э. А., Серебрянникова Г. А., Преображенский Н. А.* «Синтез природных соединений, их аналогов и фрагментов», 1965, с. 12—15; Ж. орг. хим., 1966, т. 2, № 4, с. 629—636; «Химия природных соединений», 1966, № 5, с. 306—310; № 6, с. 367—371.
102. *Титов В. И., Серебрянникова Г. А., Преображенский Н. А.*, Ж. орг. хим., 1970, т. 6, № 6, с. 1154—1159.
103. *Серебрякова Т. В., Серебрянникова Г. А., Преображенский Н. А.*, Ж. орг. хим., 1966, т. 2, № 11, с. 2004—2007; 1967, т. 3, № 8, с. 1412—1415; 1969, т. 5, № 11, с. 2030.
104. *Звоноква Е. Н., Сарычева И. К., Преображенский Н. А.*, ДАН СССР, 1964, т. 159, № 5, с. 1079—1082.
105. *Титов В. И.* и др., Ж. орг. хим., 1970, т. 6, № 12, с. 2412—2417; 1973, т. 9, № 12, с. 2487—2488.
106. *Bergelson L. D.*, "Progress in the chemistry of fats and other lipids", 1969, v. 10, p. 241—284; *Вавер В. А., Ушаков А. М., Бергельсон Л. Д.*, Успехи биол. химии, 1973, т. 14, с. 227—253.
107. *Hoefnagel M. A., De Jongh, Verkade P. E.*, Rec. trav. chim., 1962, v. 81, № 1, p. 57—68.
108. *Kramer J. K. G., Mangold H. K.*, Chem. Phys. Lipids, 1969, v. 3, № 2, p. 176—184.
109. *Baumann W. J. e. a.*, Z. physiol. Chem., 1968, Bd. 349, № 12, S. 1677—1685.
110. *Жукова И. Г., Смирнова Г. П.*, Успехи биол. химии, 1968, т. 9, с. 220—240.
111. *Carter H. E., McCluer R. H., Stijfer E. D.*, J. Am. Chem. Soc., 1956, v. 78, № 15, p. 3735—3738.
112. *Смирнова Г. В.* и др., Ж. орг. хим., 1970, т. 6, № 8, с. 1756—1757; 1971, т. 7, № 12, с. 2627.
113. *Wehrli H. P., Pomeranz Y.*, Chem. Phys. Lipids, 1969, v. 3, № 4, p. 357—370.
114. *Shinoda K. e. a.* Colloidal Surfactants. New York—London, Acad. Press, 1963. 310 p.
115. *Serdarevich B.*, J. Am. Oil Chem. Soc., 1967, v. 44, № 7, p. 381—393.
116. *Wood R., Snyder F.*, "Lipids", 1968, v. 3, № 2, p. 129—135.
117. *Ansell G. B., Hawthorne J. N.* Phospholipids. Chemistry, metabolism and function. Amsterdam, Elsevier, 1964, v. 3, 439 p.
118. *Hanahan D. J.* Lipid Chemistry. New York—London, J. Wiley, 1960, p. 330.
119. *Van Deenen L. L. M., De Haas G. H.* In: "Advances in Lipid Research", New York—London, Acad. Press, 1964, v. 2, 499 p.
120. *De Haas G. H. e. a.* In: "Biochemical Problems of Lipids". Ed. A. C. Frazer. Amsterdam, Elsevier, 1963, 474 p.
121. *Waite M. e. a.*, J. Lipid Res., 1969, v. 10, № 4, p. 411—419.
122. *Okuyama H., Nojima S.*, Biochim. Biophys. Acta, 1969, v. 173, № 1, p. 120—124.
123. *De Haas G. H. e. a.*, Biochim. Biophys. Acta, 1970, v. 221, № 1, p. 31—53, 54—61.

124. *Takahashi T., Schmid H. H. O.*, Chem. Phys. Lipids, 1968, v. 2, № 2, p. 220—222; *Slotboom A. J.* Application of lipolytic enzymes in the synthesis of monoacyl phosphoglycerides and plasmalogens. Amsterdam, 1968, p. 61.
125. *Slotboom A. J., De Haas G. H., Van Deenen L. L. M.*, Chem. Phys. Lipids, 1970, v. 4, p. 30—36.
126. *Кирби А., Уоррен С.* Органическая химия фосфора. Пер. с англ. Под ред. А. Н. Пудовкина. М., «Мир», 1971. 403 с.
127. *Хадсон Р.* Структура и механизм реакций фосфорорганических соединений. Пер. с англ. Под ред. Э. Е. Нифантьева. М., «Мир», 1967. 361 с.
128. *Slotboom A. J., Bonsen P. P. M.*, Chem. Phys. Lipids, 1970, v. 5, № 3, p. 301—398.
129. *Baer E., Maurukas J.*, J. Biol. Chem., 1955, v. 212, № 1, p. 39—48; 1961, v. 236, № 5, p. 1273—1276.
130. *Hirt R., Berchtold R.*, Helv. chim. acta, 1957, Bd. 40, № 6, S. 1928—1932.
131. *De Haas G. H., Van Deenen L. L. M.*, Biochim. Biophys. Acta, 1965, v. 106, № 2, p. 315—325.
132. *Uhlenbroek J. H., Verkade P. E.*, Rec. trav. chim., 1953, v. 72, № 5, p. 395—410; № 4, p. 365—376.
133. *Петрова М. К.* и др., Ж. орг. хим., 1969, т. 5, № 7, с. 1198—1202.
134. *Парфенов Э. А., Серебренникова Г. А., Преображенский Н. А.*, Ж. орг. хим., 1968, т. 4, № 12, с. 2241—2245; 1969, т. 5, № 12, с. 2136—2140.
135. *Barzilay J., Lapidot Y.*, Chem. Phys. Lipids, 1969, v. 3, № 3, p. 280—286.
136. *Aneja R., Chadha J. S., Davies A. P.*, "Tetrahedron Letters", 1969, № 48, p. 4183—4186.
137. *Baer E., Duke A. J., Buchnea D.*, Can. J. Biochem., 1968, v. 46, № 1, p. 69—74.
138. *Baer E., Suzuki J., Blackwell J.*, Biochemistry, 1963, v. 2, № 6, p. 1227—1232.
139. *Rakhit S., Bagei J. F., Deghenghi R.*, Can. J. Chem., 1969, v. 47, № 15, p. 2906—2910.
140. *Billimoria J. D., Chadha J. S., Knaggs J. A.*, Biochim. Biophys. Acta, 1969, v. 187, № 4, p. 579—580.
141. *Серебренникова Г. А.* и др., Ж. орг. хим., 1972, т. 8, № 6, с. 1171—1174.
142. *Pfeiffer F., Cohen S., Weisbach J.*, J. Org. Chem., 1969, v. 34, № 9, p. 2795—2796.
143. *Haas G., Deenen L.*, Rec. trav. chim., 1962, v. 81, № 3, p. 215—218.
144. *Bonsen P. P. M., De Haas G. H.*, Chem. Phys. Lipids, 1967, v. 1, № 2, p. 100—109.
145. *Lapidot Y., Selinger Z.*, J. Am. Chem. Soc., 1965, v. 87, № 23, p. 5522—5523.
146. *Baer E., Pavanaram S. V.*, J. Biol. Chem., 1961, v. 236, № 9, p. 2410—2415.
147. *Молютовский Ю. Л., Лазуркина Т. У., Бергельсон Л. Д.*, Изв. АН СССР. Сер. хим., 1969, № 8, с. 1784—1789.
148. *Brockerhoff H., Yurkowski M.*, Can. J. Biochem., 1965, v. 43, № 11, p. 1777—1786.
149. *Cubero Robles E., De Jongh H.*, Rec. trav. chim., 1967, v. 86, № 8, p. 762—764.
150. *De Haas G. H., Van Deenen L. L. M.*, "Tetrahedron Letters", 1960, № 1, p. 7—12.
151. *Швец В. И.* и др., ЖОХ, 1963, т. 33, № 9, с. 2876—2879.
152. *Billimoria J. D., Lewis K. O.*, J. Chem. Soc. (C), 1968, № 12, p. 1404—1412.
153. *Поляченко В. М., Самохвалов Г. И., Преображенский Н. А.*, ЖОХ, 1962, т. 32, № 2, с. 396—399.
154. *Daemen F. J. M.*, Chem. Phys. Lipids, 1967, v. 1, № 5, p. 476—481.
155. *Aneja R. e. a.*, Chem. Phys. Lipids, 1969, v. 3, № 2, p. 185—189.
156. *Aneja R. e. a.*, Biochim. Biophys. Acta, 1969, v. 187, № 3, p. 439—441.
157. *Aneja R., Chadha J. S., Knaggs J. A.*, Biochem. Biophys. Res. Comm., 1969, v. 36, № 4, p. 401—410.
158. *Turner D. L., Silver M. J.*, Nature, 1963, v. 200, № 4904, p. 370—371.
159. *Швец В. И.* и др., ЖОХ, 1966, т. 36, № 1, с. 49—54.
160. *Петрова М. К.* и др. «Синтез природных соединений, их аналогов и фрагментов», 1965, с. 27—32.
161. *Turner D. L., Silver M. J.*, "Lipids", 1966, v. 1, № 6, p. 439—443.
162. *Швец В. И.* и др., ЖОХ, 1967, т. 37, № 7, с. 1454—1458.
163. *Saunders K. M., Schwarz H. P.*, J. Am. Chem. Soc., 1966, v. 88, № 16, p. 3844—3847.
164. *Bonsen P. P. M., De Haas G. H., Van Deenen L. L. M.*, Chem. Phys. Lipids, 1966, v. 1, № 1, p. 33—40.
165. *Lennarz W. J., Bonsen P. P. H., Van Deenen L. L. M.*, "Biochemistry", 1967, v. 6, № 8, p. 2307—2312.
166. *Joo C. N., Kates M.*, Biochim. Biophys. Acta, 1968, v. 152, № 4, p. 800—803; 1969, v. 176, № 2, p. 278—281.
167. *Bonsen P. P. M., De Haas G. H., Deenen L. L. M.*, Biochim. Biophys. Acta, 1965, v. 106, № 1, p. 93—105.

168. Молотковский Ю. Г., Бергельсон Л. Д., Chem. Phys. Lipids, 1968, v. 2, № 1, p. 1—10; Изв. АН СССР. Сер. хим., 1966, № 6, с. 1098—1099; 1967, № 4, с. 925—927; 1967, № 10, с. 2321—2327; 1967, № 11, с. 2498—2504.
169. Bonsen P. P. M., De Haas G. H., Van Deenen L. L. M., "Biochemistry", 1967, v. 6, № 4, p. 1114—1120.
170. Швец В. И. и др., Ж. орг. хим., 1967, т. 3, № 7, с. 1179—1182.
171. De Haas G. H., Van Deenen L. L. M., Rec. trav. chim., 1965, v. 84, № 3, p. 436—438; 1963, v. 82, № 11, p. 1163—1172.
172. Inoue K., Nojima S., Chem. Pharm. Bull. (Tokyo), 1968, v. 16, № 1, p. 76—81.
173. Snyder F., "Progress in the chemistry of fats and other lipids", 1969, v. 10, pt. 1, p. 289—335.
174. Warner H. R., Lands W. E. M., J. Am. Chem. Soc., 1963, v. 85, № 1, p. 60—64; Norton W. T., Gottfried E. L., Rapport M. M., J. Lipid Res., 1962, v. 3, № 3, p. 456—459.
175. Craig J. C., Hamon D. P. G., Chem. Ind., 1965, № 36, p. 1559—1560.
176. Craig J. C., Hamon D. P. G., "Tetrahedron", 1966, v. 22, № 1, p. 175—178.
177. Slotboom A. J., De Haas G. H., Van Deenen L. L. M., Chem. Phys. Lipids, 1967, v. 1, № 2, p. 192—200.
178. Серебренникова Г. А., Титов В. И., Преображенский Н. А., Ж. орг. хим., 1969, т. 5, № 3, с. 550—555; 1970, т. 6, № 6, с. 1151—1154.
179. Второв И. Б., Серебренникова Г. А., Преображенский Н. А., Ж. орг. хим., 1970, т. 6, № 4, с. 669—674.
180. Второв И. Б., Серебренникова Г. А., Евстигнеева Р. П., Ж. орг. хим., 1971, т. 6, № 4, с. 657—660.
181. Второв И. Б., Серебренникова Г. А., Евстигнеева Р. П., Ж. орг. хим., 1971, т. 7, № 4, с. 660—664.
182. Vtorov I. B., Serebrennikova G. A., Eustigneeve R. P., "Tetrahedron Letters", 1971, № 48, p. 4605—4608; Ж. орг. хим., 1972, т. 8, № 4, с. 721—726.
183. Титов В. И., Серебренникова Г. А., Евстигнеева Р. П., Ж. орг. хим., 1972, т. 8, № 12, с. 2516—2520.
184. Титов В. И., Серебренникова Г. А., Евстигнеева Р. П., Ж. орг. хим., 1972, т. 8, № 6, с. 1166—1170.
185. Tentative Rules for Cyclitol nomenclature: J. Biol. Chem., 1968, v. 243, № 22, p. 5809—5819.
186. Кляшицкий Б. А., Швец В. И., Ж. орг. хим., 1969, т. 5, № 1, с. 192—193.
187. Brockerhoff H., Ballou C. E., J. Biol. Chem., 1961, v. 236, № 7, p. 1907—1911.
188. Pangborn M. C., Mckinney J. A., J. Lipid Res., 1966, v. 7, № 5, p. 627—633; Brenhan P., Ballou C. E., J. Biol. Chem., 1967, v. 247, № 13, p. 3046—3056.
189. Angyal S. J., Melrose G. J. H., J. Chem. Soc. (C), 1965, № 11, p. 6494—6500.
190. Angyal S. J. e. a., J. Chem. Soc. (C), 1965, № 11, p. 6662—6664.
191. Angyal S. J., Gilham R. T., J. Chem. Soc., 1957, № 3, p. 1417—1422.
192. Gigg R., Warren C. D., J. Chem. Soc. (C), 1969, № 18, p. 2367—2371.
193. Angyal S. J., Tate M. E., J. Chem. Soc., 1961, № 9, p. 4122—4128.
194. Angyal S. J., Merlose G. J., J. Chem. Soc. (C), 1965, № 10, p. 5252—5255; 1965, № 12, p. 6949—6955.
195. Gigg R., Warren C. D., "Tetrahedron Letters", 1966, № 36, p. 2415—2417.
196. Angyal S. J., Randall M. H., Tate M. E., J. Chem. Soc. (C), 1967, № 10, p. 919—922.
197. Швец В. И., «Успехи химии», 1974, т. 43, № 6, с. 1074—1101.
198. Gent P., Gigg R., Warren C., "Tetrahedron Letters", 1970, № 28, p. 2575—2578.
199. Лукьянов А. В. и др., ЖОХ, 1966, т. 36, № 6, с. 1029—1031; 1968, т. 38, № 10, с. 2251—2254.
200. Лукьянов А. В. и др., «Химия природных соединений», 1966, № 5, с. 230—233.
201. Кляшицкий Б. А., Соколов С. Д., Швец В. И., «Успехи химии», 1969, т. 38, № 4, с. 740—785.
202. Ballou C., Pizer L., J. Am. Chem. Soc., 1959, v. 81, № 17, p. 4745.
203. Mercier D., Barnett J., Gero S., "Tetrahedron", 1969, v. 25, № 23, p. 5681—5687.
204. Желвакова Э. Г. и др., «Химия природных соединений», 1970, № 2, с. 163—167.
205. Швец В. И., «Успехи химии», 1971, т. 40, № 4, с. 625—653.
206. Klyashchitskii B. A. e. a., "Tetrahedron Letters", 1970, № 8, p. 587—590.
207. Кляшицкий Б. А. и др., ЖОХ, 1970, т. 40, № 1, с. 236—242; № 5, с. 1148—1152; Ж. орг. хим., 1970, т. 6, № 1, с. 62—65.
208. Кляшицкий Б. А. и др., ЖОХ, 1969, т. 39, № 10, с. 2373—2376; № 11, с. 2482—2483.
209. Кляшицкий Б. А. и др., ДАН СССР, 1970, т. 195, № 4, с. 848—850.

210. *Molotkowski J. G., Bergelson L. D.*, "Tetrahedron Letters", 1971, № 50, p. 4791—4794.
211. *Shaw N., Stead A.*, FEBS — Letters, 1972, v. 21, № 1, p. 249—251.
212. *Gurr M. J., Bonsen P. P. M., Van Deenen L. L. M.*, Biochem. J., 1968, v. 106, № 4, p. 46—47; Chem. Phys. Lipids, 1971, v. 6, № 1, p. 46—57.
213. *Billimoria J. D., Lewis K. O.*, Chem. Ind., 1968, № 49, p. 1731—1732.
214. *Verheij H. M. e. a.*, Biochim. Biophys. Acta, 1970, v. 218, № 1, p. 97—101; *Лущинская М. Г. и др.*, ЖОХ, 1971, т. 41, № 2, с. 446—449.
215. *Baer E., Stanacev N. Z.*, Can. J. Biochem., 1968, v. 46, № 10, p. 1273—1278; 1967, v. 45, № 2, p. 317—325.
216. *Baer E., Hemendra Basu, Pal B. C.*, Can. J. Biochem., 1967, v. 45, № 9, p. 1467—1468.
217. *Петрова М. К. и др.*, Ж. орг. хим., 1969, т. 5, № 7, с. 1198—1202.
218. *Carter H. E., Harrison J. B., Shapiro D.*, J. Am. Chem. Soc., 1953, v. 75, № 19, p. 4705—4709.
219. *Carter H. E., Shapiro D., Harrison J. B.*, J. Am. Chem. Soc., 1953, v. 75, № 4, p. 1007—1008.
220. *Jenny E. F., Grob C. A.*, Helv. chim. acta, 1953, Bd. 36, № 6, S. 1454—1463.
221. *J. Lipid Res.*, 1967, v. 8, № 5, p. 523—533.
222. *Michalec C.* Biochemistry of Sphingolipids. Praha, Makladatelstvi ceskoslovenske akademie ved, 1967. 115 p.
223. *Karlsson K.-A.*, Chem. Phys. Lipids, 1970, v. 5, № 1, p. 60—67.
224. *Вейнберг А. Я., Вакулова Л. А., Самохвалов Г. И.*, Ж. орг. хим., 1965, т. I, вып. 5, с. 968—973.
225. *Shapiro D.* Chemistry of Sphingolipids. Paris, Hermann, 1969. 111 p.
226. *Grob C. A., Jenny E. F., Utzinger H.*, Helv. chim. acta, 1951, Bd. 34, № 7, S. 2249—2254; *Egerton M. J., Gregory G. I., Malkin T.*, J. Chem. Soc., 1952, № 6, p. 2272—2275.
227. *Grob C. A., Gadiet F.*, Helv. chim. acta, 1957, Bd. 40, № 5, S. 1145—1157; Chem. Ind., 1956, № 7, p. 660—661.
228. *Jenny E. F., Druet J.*, Helv. chim. acta, 1959, Bd. 42, № 2, S. 401—406.
229. *Majhofer-Orescanin B., Postenik M.*, "Tetrahedron", 1961, v. 12, № 1, p. 56—62.
230. *Klepp M., Libert H., Schmidt L.*, Monatsh., 1967, Bd. 98, № 2, S. 373—378.
231. *Вейнберг А. Я. и др.*, ЖОХ, 1964, т. 34, вып. 12, с. 3979—3982.
232. *Shapiro D., Segal H.*, J. Am. Chem. Soc., 1954, v. 76, № 11, p. 5894—5895.
233. *Shapiro D., Segal H., Flowers H. M.*, J. Am. Chem. Soc., 1958, v. 80, № 3, p. 1194—1197.
234. *Shapiro D., Segal H., Flowers H. M.*, J. Am. Chem. Soc., 1958, v. 80, № 5, p. 2170—2171; *Shapiro D., Sheradsky T.*, J. Org. Chem., 1963, v. 28, № 8, p. 2157.
235. *Звонкова Е. Н. и др.* Ж. орг. хим., 1968, т. 4, вып. 2, с. 207—210.
236. *Звонкова Е. Н. и др.* Ж. орг. хим., 1970, т. 6, вып. 1, с. 58—62.
237. *Kisic A. e. a.*, Chem. Phys. Lipids, 1971, v. 7, № 3, p. 135—143.
238. *Звонкова Е. Н. и др.* Ж. орг. хим., 1972, т. 8, вып. 9, с. 1799—1802.
239. *Jenny E., Grob C. A.*, Helv. chim. acta, 1953, Bd. 36, № 7, S. 1936—1944.
240. *Sisido K., Hirowatari N., Isida I.*, J. Org. Chem., 1964, v. 29, № 9, p. 2783—2784; v. 34, № 11, p. 3539—3544.
241. *Звонкова Е. Н. и др.* Ж. орг. хим., 1966, т. 2, вып. 12, с. 2184—2186; 1968, т. 4, вып. 4, с. 532—533; *Эллер К. И., Звонкова Е. Н., Преображенский Н. А.*, Ж. орг. хим., 1969, т. 5, вып. 12, с. 2140—2143.
242. *Эллер К. И. и др.* Ж. орг. хим., 1970, т. 6, вып. 4, с. 665—668.
243. *Завьялов С. И. и др.* Изв. АН СССР. Сер. хим., 1970, № 5, с. 1119—1126.
244. *Gigg G., Gigg R., Warren C. D.*, J. Chem. Soc. (C), 1966, № 20, p. 1882—1885; *Gigg G., Gigg R.*, J. Chem. Soc. (C), 1966, № 20, p. 1876—1879; *Gigg R., Warren C. D.*, J. Chem. Soc. (C), 1966, № 20, p. 1879—1882.
245. *Sticht G., Le Kim D., Stoffel W.*, Chem. Phys. Lipids, 1972, v. 8, № 1, p. 10—25.
246. *Завьялов С. И., Аронова Н. И., Махова Н. Н.* В кн.: Реакции и методы исследования органических соединений. Т. 22, М., «Химия», 1971, с. 17—39; *Соколова Н. А. и др.*, Ж. орг. хим., 1973, т. 9, вып. 3, с. 483—485.
- 246a. *Grob C. A., Jenny E. R.*, Helv. chim. acta, 1952, Bd. 35, № 6, S. 2106—2111.
247. *Carter H. E., Shapiro D.*, J. Am. Chem. Soc., 1953, v. 75, № 20, p. 5131—5132.
248. *Shapiro D., Flowers H. M.*, J. Am. Chem. Soc., 1961, v. 83, № 8, p. 3327—3332.
249. *Baer E., Sarma G.*, Can. J. Biochem., 1969, v. 47, № 6, p. 603—610.
250. *Reist E. J., Cristie P. H.*, J. Org. Chem., 1970, v. 35, № 10, p. 3521—3524; *Reist E. J., Cristie P. H.*, J. Org. Chem., 1970, v. 35, № 12, p. 4127—4130.
251. *Shapiro D.*, J. Am. Oil Chem. Soc., 1965, v. 42, № 4, p. 267—270.

252. *Shapiro D., Rachman E. S., Sheradsky T.*, J. Am. Chem. Soc., 1964, v. 86, № 20, p. 4472—4476.
253. *Звонкова Е. Н.* и др., Ж. орг. хим., 1967, т. 3, вып. 7, с. 1340—1341; *Бушнев А. С.* и др., Ж. орг. хим., 1970, т. 6, вып. 7, с. 1413—1415.
254. *Hay I. B., Gray G. M.*, Chem. Phys. Lipids, 1969, v. 1, № 3, p. 59—69.
255. *Бушнев А. С.* и др., Ж. орг. хим., 1971, т. 7, вып. 10, с. 2132—2136; *Бушнев А. С., Звонкова Е. Н., Евстигнеева Р. П.*, Ж. орг. хим., 1971, т. 7, вып. 11, с. 2311—2316.
256. *Shapiro D., Flowers H. M., Spector-Shefer S.*, J. Am. Chem. Soc., 1959, v. 81, № 12, p. 3743—3749.
257. *Shapiro D., Flowers H. M., Spector-Shefer S.*, J. Am. Chem. Soc., 1959, v. 81, № 16, p. 4360—4364.
258. *Shapiro D., Flowers H. M.*, J. Am. Chem. Soc., 1962, v. 84, № 6, p. 1047—1050.
259. *Shapiro D. e. a.*, Chem. Phys. Lipids, 1967, v. 1, № 3, p. 183—191.
260. *Rabinsohn Y. e. a.*, Chem. Phys. Lipids, 1968, v. 2, № 2, p. 223—226.
261. *Мицнер Б. И.* и др., Ж. орг. хим., 1968, т. 4, вып. 2, с. 210—213.
262. *Звонкова Е. Н.* и др., Ж. орг. хим., 1973, т. 9, вып. 1, с. 31—35.
263. *Мицнер Б. И.* и др., ЖОХ, 1970, т. 40, вып. 4, с. 942—943.
264. *Вейнберг А. Я., Вакулова Л. А., Самохвалов Г. И.*, «Успехи химии», 1966, т. 35, вып. 11, с. 2072—2102.
265. *Кочетков Н. К., Жукова И. Г., Глухоед И. С.*, ДАН СССР, 1961, т. 139, № 3, с. 608—611; 1962, т. 147, № 2, с. 376—379; «Биохимия», 1964, т. 29, № 3, с. 570—575.
266. *Shapiro D., Flowers H. M.*, J. Am. Chem. Soc., 1959, v. 81, № 8, p. 2023—2024.
267. *Shapiro D. e. a.*, Chem. Phys. Lipids, 1966, v. 1, № 1, p. 54—62.
268. *Жукова И. Г.* и др., Изв. АН СССР. Сер. хим., 1970, № 2, с. 411—419.
269. *Shapiro D., Acher A. J., Rachman E. S.*, J. Org. Chem., 1967, v. 32, № 12, p. 3767—3771; *Acher A. J., Shapiro D.*, J. Org. Chem., 1969, v. 34, № 9, p. 2652—2654; *Shapiro D., Acher A. J.*, J. Org. Chem., 1970, v. 35, № 1, p. 229—231; *Shapiro D. e. a.*, J. Org. Chem., 1970, v. 35, № 5, p. 1464—1467.
270. *Малер Г., Кордес Ю.* Основы биологической химии. Пер. с англ. Под ред. А. А. Баева и Я. М. Варшавского. М., «Мир», 1970. 567 с.; *Будницкая Е. В.*, Усп. биол. химии, 1965, т. 7, с. 225—238.
271. *Vagelos P. R., Magerus R. W., Alberts A. W.*, Fed. Proc., 1966, v. 25, № 5, p. 1485—1487; «Biochemistry», 1964, v. 3, № 10, p. 1563—1577; *Lynen F.*, Biochem. J., 1972, v. 128, № 1, p. 1P—2P.
272. *Wakil S.* In: Metabolism and Physiological Significance of Lipids. L., Wiley, 1964. 657 p.
273. *Mooney L. A., Barron E. Y.*, Biochemistry, 1970, v. 9, № 10, p. 2138—2152.
274. *Shapiro B.*, Ann. Rev. Biochem., 1967, v. 36, № 1, p. 247—270.
275. *Clark B., Hübscher G.*, «Nature», 1960, v. 185, № 4705, p. 35—37; Biochim. Biophys. Acta, 1961, v. 46, № 3, p. 479—494.
276. *Verger R., Sarda L., Desnuelle P.* Biochim. Biophys. Acta, 1970, v. 207, № 2, p. 377—385.
277. *Верецагин А. Г.*, Усп. биол. химии, 1967, т. 8, с. 206—250.
278. *Wenger D. A., Rao K. S., Pieringer R. A.*, J. Biol. Chem., 1970, v. 245, № 10, p. 2513—2519; *Bajwa S. S., Sastry P. S.*, Biochem. J., 1972, v. 128, № 1, p. 44.
279. *Rao K. S., Wenger D. A., Pieringer R. A.*, J. Biol. Chem., 1970, v. 245, № 10, p. 2520—2524.
280. *Стрикланд К.* В кн.: Биогенез природных соединений. Пер. с англ. Под ред. А. М. Гиномдана. М., «Мир», 1965. 723 с.
281. *Kates M.* In: Lipid Metabolism. Ed. Bloch K. New York—London, 1960. 411 p.; *Spanner S.*, Biochem. J., 1971, v. 122, № 5, p. 741—750.
282. *Kanfer J. N., Kennedy E. P.*, Fed. Proc., 1962, v. 21, № 2, p. 280—282.
283. *Prottey C., Ballou C. E.*, J. Biol. Chem., 1968, v. 243, № 23, p. 6196—6201.
284. *Stancev N. Z., Stuhne-Sekales L.*, Biochim. Biophys. Acta, 1970, v. 210, № 2, p. 350—352.
285. *Liang C. R., Rosenberg H.*, Biochim. Biophys. Acta, 1968, v. 156, № 2, p. 437—439; *Thompson G. A.*, Biochim. Biophys. Acta, 1969, v. 176, № 2, p. 330—338.
286. *Agranoff B. F., Brady R. O.* In: The neurochemistry of nucleotides. Ed. R. O. Brady, D. Tower, New York—London, 1960. 292 p.; *Thompson W., Subrahman D., Strickland K. P.*, Fed. Proc., 1960, v. 19, № 1, p. 234—235.
287. *Brokerhoff H., Ballou C. E.*, J. Biol. Chem., 1962, v. 237, № 1, p. 49—52; № 8, p. 1764—1768; «Biochemistry», 1966, v. 5, № 1, p. 353—358.
288. *Snyder F.*, J. Biol. Chem., 1970, v. 245, № 7, p. 1790—1799; № 12, p. 3047—3058.
289. *Blank M. L., Piantadosi C., Snyder F.*, Biochim. Biophys. Acta, 1970, v. 210, № 3,

- p. 442—447; *Debuch H., Friedemann H., Müller J.*, Z. physiol. Chem., 1970, Bd. 351, № 5, S. 613—621.
290. *Wood R., Healy K.*, J. Am. Oil Chem. Soc., 1970, v. 47, № 2, p. 79A; *Paltauf F.*, Biochim. Biophys. Acta, 1972, v. 260, № 3, p. 352—364.
291. *Morell P., Braun P.*, J. Lipid Res., 1972, v. 13, № 3, p. 293—310.
292. *Stoffel M.*, Chem. Phys. Lipids, 1970, v. 5, № 1, p. 139—158; *Snell E. E., DiMari S. J., Brady R. N.*, Chem. Phys. Lipids, 1970, v. 5, № 1, p. 116—138.
293. *Gatt S.*, Chem. Phys. Lipids, 1970, v. 5, № 1, p. 235—249.
294. *Rouser G., Gall C., Kritchevsky G.*, J. Am. Oil Chem. Soc., 1965, v. 42, № 5, p. 404—409.
295. *Dawson G., Stein A. O.*, "Science", 1970, v. 170, № 3957, p. 556—558.
296. Brain Lipid and Lipoproteins and the Leucodystrophies. Ed. J. Folch-Pi, H. Bauer. Amsterdam, Elsevier, 1963. 213 p.
297. *Cook M. H., Martin W. G.* In: Structural and functional aspects of lipoproteins in living systems. Ed. F. Fria, A. M. Scanu. London—New York, Acad. Press, 1969. 220 p.
298. *Hirtch F. T., Lees R. S.* Adv. in Lipid Research, 1968, v. 6. 421 p.
299. Троицкий Г. В. В кн.: Химические основы процессов жизнедеятельности. Под ред. В. Н. Ореховича. М., Изд. мед. лит., 1962. 330 с.
300. *Gustafson A., Alaupovic P., Furman R. H.*, "Biochemistry", 1966, v. 5, № 2, p. 632—640.
301. *Gurd F. R. N.* "Comprehensive Biochemistry", 1963, v. 7. 280 p.
302. *Лёви А., Сикевич Ф.* Структура и функции клетки. Пер. с англ. Под ред. Б. Ф. Поглазова, Ю. Ф. Ченцова. М., «Мир», 1971. 583 с.
303. *Malhotra S. K.* In: Progress in biophysics and molecular biology. V. 20. Oxford—New York—Toronto—Sydney, 1970. 431 p.
304. *Robertson J. D.* "Handbook of molecular cytology", 1969, v. 15, E. L. Fatum. Amsterdam—London, 1969, v. 15, 1508 p.
305. *Руд Э.* В кн.: Цитология ферментов. Пер. с англ. Под ред. А. А. Покровского. М., «Мир», 1971. 397 с.
306. *Davies R. P.* e. a. Biological membranes. V. 2. Ed. D. Chapman. London—New York, Acad. Press, 1973. 326 p.
307. *Krenc E. M.* Фосфолипиды клеточных мембран нервной системы в развитии животного мира. Л., «Наука», 1967. 72 с.
308. *Грин Д., Гольдберг Р.* Молекулярные аспекты жизни. Пер. с англ. Под ред. Я. М. Варшавского. М., «Мир», 1968. 400 с.
309. *Van Deenen L. L. M.*, "Progress in the chemistry of Fats and other Lipids", 1965, v. 8, pt. 1, p. 1—113.
310. *Гельман Н. С.*, «Успехи современной биологии», 1967, т. 64, № 3, с. 379—398.
311. *Korn E. D.* In: Theoretical and Experimental biophysics. V. 2. Ed. A. Cole. N. Y., Dekker, 1969. 343 p.
312. *Menke W.* In: Biochemistry of chloroplasts. V. 1. Ed. T. W. Goodwin, London—New York, Acad. Press, 1966. 476 p.
313. *Sjöstrand F.*, Protoplasma, 1967, v. 63, № 3, p. 248—261.
314. *Green D. E., Perdue J. F.*, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1966, v. 55, № 5, p. 1295—1307.
315. *Фрей-Вислинг А., Мюлеталер К.* Ультраструктура растительной клетки. Пер. с англ. Под ред. Н. Л. Клячко, Н. В. Цингер. М., «Мир», 1968. 453 с.
316. Хлоропласты и митохондрии. Под ред. А. А. Шахова. М., «Наука», 1969. 343 с.
317. *Wallach D. F. H.*, In: Membrane models and the formation of biological membranes. Ed. L. Bolis, B. A. Pethica. Amsterdam, 1968. 337 p.
318. *Гельман Н. С.* «Успехи современной биологии», 1969, т. 68, № 1, с. 3—18.
319. *Поглазов Б. Ф.* Сборка биологических структур. М., «Наука», 1970. 155 с.
320. *Dawson R. M. C.* In: Essays in Biochemistry. V. 2. Eds P. N. Campbell, G. D. Greville. N. Y., Acad. Press, 1966. 227 p.
321. *Lakshminarayanaiah N.* Transport phenomena in membranes. 2-nd print. New York—London, Acad. Press, 1972. 517 p.
322. *Hokin L. E., Hokin R. M.*, Ann. Rev. Biochem., 1963, v. 32, № 1, p. 553—578.
323. *Fleischer S., Klowen H.*, J. Biol. Chem., 1963, v. 238, № 8, p. 2654—2659; *Green D., Fleischer S.*, Biochim. Biophys. Acta, 1963, v. 70, № 5, p. 554—582.
324. *Катц Б.* Нерв, мышца и синапс. Пер. с англ. Под ред. В. С. Гурфинкеля. М., «Мир», 1968. 220 с.
325. *Лейтес Ф. Л.* Гистохимия липолитических ферментов в норме и при патологии липоидного обмена. М., «Медицина». 1967. 245 с.

IV. ОБМЕН ВЕЩЕСТВ

ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ

Обмен веществ представляет собой сложный ансамбль многочисленных, тесно связанных друг с другом биохимических процессов, соединяющий в единую систему представителей всех классов биологически активных природных соединений. Ведущая роль в этих превращениях принадлежит белкам. Благодаря каталитической функции белков-ферментов осуществляются процессы распада и биосинтеза. С помощью нуклеиновых кислот создается видовая специфичность при биосинтезе важнейших биополимеров. В результате обмена углеводов и липидов постоянно возобновляются запасы АТФ — универсального донора энергии для химических преобразований. Эти же соединения являются источником простейших органических молекул, из которых строятся биополимеры и другие вещества.

Взаимосвязь и взаимообусловленность биохимических превращений, возможность переходов от одного класса органических соединений к другому являются характерными чертами обмена веществ. Общий ход биохимических процессов в организме, регулируемый внутренними и внешними факторами, представляет собой единое неразрывное целое, а организм является саморегулирующейся системой, которая поддерживает свое существование с помощью обмена веществ.

Метаболические пути, т. е. последовательности ферментативных реакций, из которых состоит обмен веществ, разделяют на два типа: катаболические и анаболические.

Катаболизм — это процессы расщепления, в ходе которых крупные органические молекулы, в первую очередь пищевые продукты, разрушаются до простых компонентов.

Анаболизм — это биосинтез сложных компонентов клетки из более простых предшественников.

В зависимости от последовательности процессов обмена их можно разделить на четыре группы.

1. Пищеварение — процессы, происходящие в желудочно-кишечном тракте и подготовляющие всасывание питательных веществ (к пищеварению относится и бактериальное воздействие со стороны кишечной флоры).

2. Резорбция — процессы всасывания питательных веществ через слизистую оболочку кишок.

3. Промежуточный обмен — внутриклеточные ферментативные процессы биосинтеза и расщепления.

4. Выделение конечных продуктов обмена.

Катаболизм большинства веществ, содержащихся в пищевых продуктах, происходит в три стадии (рис. 28).

На первой стадии (пищеварение) высокомолекулярные компоненты пищи расщепляются на более мелкие фрагменты. Белки превращаются

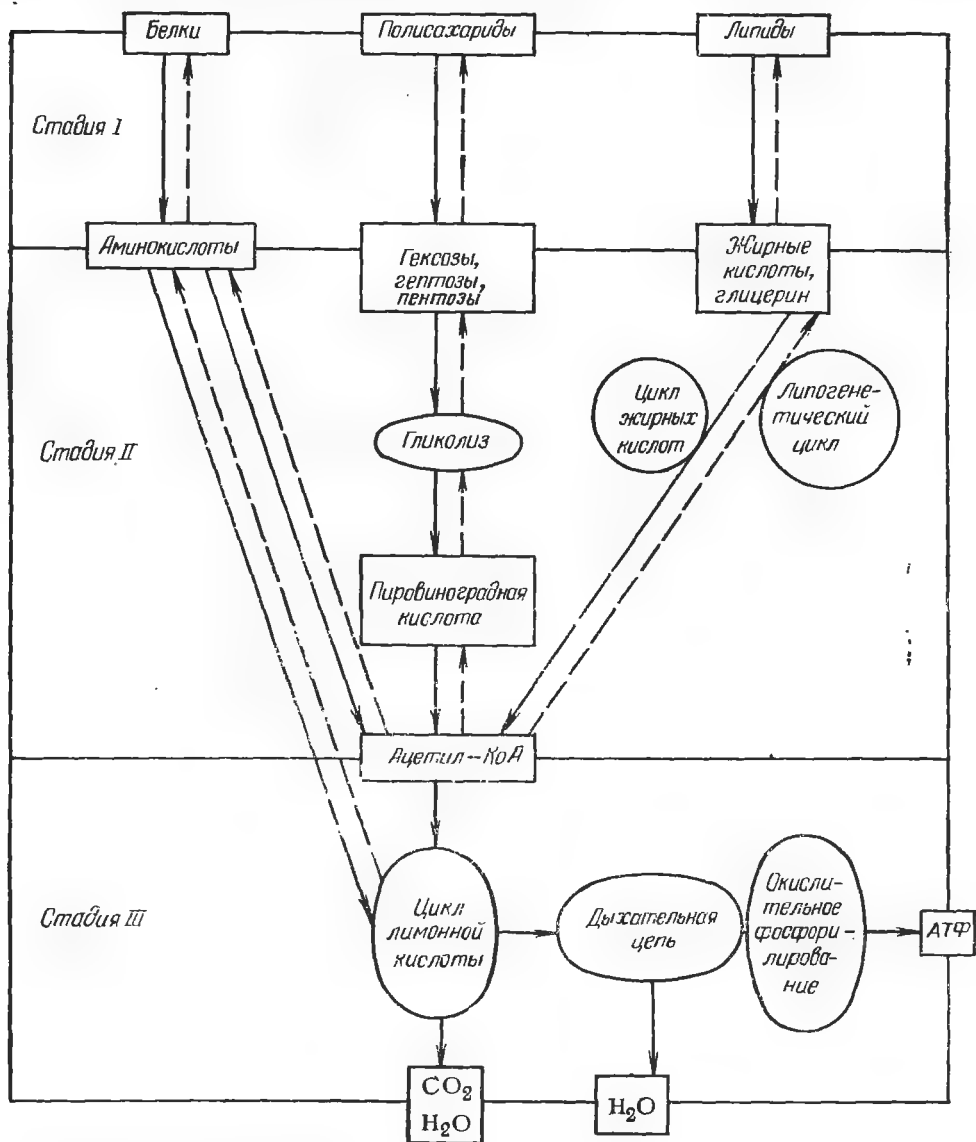


Рис. 28. Три стадии катаболизма и анаболизма:

→ — пути катаболизма;
 — — — — — пути анаболизма.

в аминокислоты, полисахариды — в моносахариды, липиды гидролизуются с образованием жирных кислот, глицерина и азотистых оснований. Конечными продуктами первой стадии метаболизма являются около 20 аминокислот, три гексозы (глюкоза, галактоза и фруктоза), пентоза

(рибоза), высшие жирные кислоты, глицерин, нуклеозиды и некоторые другие соединения.

На второй стадии (начальная стадия промежуточного обмена) моносахариды и глицерин превращаются в пировиноградную кислоту, жирные кислоты — в ацетил-КоА, аминокислоты — в α -кетоглутаровую, фумаровую, щавелевоуксусную и пировиноградную кислоты и в ацетил-КоА. (Пути метаболизма моносахаридов, глицерина и жирных кислот см. стр. 64, 346.)

На третьей стадии (конечная фаза промежуточного обмена) ацетил-КоА, α -кетоглутаровая, фумаровая и щавелевоуксусная кислоты окисляются в цикле лимонной кислоты до двуокиси углерода.

Анаболизм тоже состоит из трех стадий, причем соединения, образовавшиеся на третьей стадии катаболизма, являются исходными веществами в процессе анаболизма. Например, биосинтез белков начинается с α -кетокислот, получающихся на третьей стадии катаболизма; на второй стадии α -кетокислоты превращаются в α -аминокислоты; на третьей стадии анаболизма из α -аминокислот создаются пептидные цепи. Пути катаболизма и анаболизма в большинстве случаев неидентичны.

С помощью центральных путей метаболизма продукты катаболизма становятся субстратами в процессах анаболизма. Центральные (амфиболические) пути обмена веществ включают главным образом следующие превращения:

- 1) Триозофосфат $\rightleftharpoons$ Пировиноградная кислота (см. стр. 69)
- 2) Пировиноградная кислота $\rightleftharpoons$ Ацетил-КоА (см. кн. I, стр. 281—283)
- 3) Щавелевоуксусная кислота $\rightleftharpoons$ Пировиноградная кислота (см. кн. I, стр. 295)
- 4) α -Кетоглутаровая кислота $\rightleftharpoons$ Глутаминовая кислота (см. кн. I, стр. 295)
- 5) Цикл лимонной кислоты (см. стр. 399)

Катаболические реакции являются источниками энергии, которая вырабатывается в форме АТФ в результате окислительного фосфорилирования в дыхательной цепи. В анаболических процессах происходит потребление энергии в форме АТФ. Процессы катаболизма являются преимущественно окислительными и служат источниками восстановленных форм никотинамиднуклеотидов (НАД-Н и НАДФ-Н), потребляемых при анаболизме. На конечных стадиях катаболизма происходит удаление из организма большинства метаболитов в форме CO_2 , H_2O , NH_4^+ (или мочевины и некоторых других азотсодержащих соединений).

Уменьшение количества промежуточных продуктов наблюдается при анаболизме. Источниками метаболитов являются так называемые *анаплеротические пути* — вспомогательные реакции, в результате которых в общий фонд метаболитов включаются одноуглеродные фрагменты (в форме CO_2) или двууглеродные фрагменты (в форме ацетил-КоА).

Дополнительные данные об обмене веществ см. [1—9].

ПИЩЕВАРЕНИЕ И РЕЗОРБИЦИЯ

Процессы пищеварения осуществляются в пищеварительном тракте, который включает полость рта, пищевод, желудок, двенадцатиперстную кишку, кишечник (тонкая и толстая кишки).

Основными функциями пищеварительного тракта являются секреторная, моторная, всасывательная и экскреторная. Секреторная функция состоит в выработке клетками желез пищеварительных соков: слюны, желудочного сока, сока поджелудочной железы (панкреатический сок) и кишечного сока, а также желчи. Моторная (двигательная) функция осуществляется мускулатурой пищеварительного аппарата и обеспечивает жевание, глотание, движение пищи вдоль пищеварительного тракта и выделение непере-

варенных остатков. Всасывание происходит в слизистой оболочке желудка, тонких и толстых кишках. Экскреторная функция заключается в выделении из организма некоторых продуктов обмена (например, желчных пигментов) и солей тяжелых металлов. Все функции органов пищеварения подчинены сложным нервным и гуморальным механизмам регуляции.

В процессе пищеварения молекулы питательных веществ растительного и животного происхождения (белки, углеводы, липиды, нуклеиновые кислоты и другие) гидролитически расщепляются до низкомолекулярных соединений. Клетки стенок пищеварительного тракта снабжены полупроницаемыми мембранами, пропускающими лишь молекулы относительно небольшого размера. Соединения, всосавшиеся через стенки кишечника и слизистой желудка, поступают в кровь и транспортируются по кровеносной системе к использующим их клеткам организма.

Процессы пищеварения происходят под действием пищеварительных соков. Все пищеварительные соки за исключением желчи содержат ферменты гидролазы, воду, неорганические ионы и другие соединения. Важнейшими компонентами желчи являются желчные кислоты, желчные пигменты и холестерин. На различных участках пищеварительного тракта рН пищеварительных соков неодинаков (см. табл. 20). Благодаря этому ферменты, характеризующиеся различным оптимумом рН, выполняют переваривающую функцию.

Расщепление белков пищи начинается в желудке, где они гидролизуются под действием пепсина желудочного сока с образованием смеси пептидов. У младенцев жизненно важную роль выполняет фермент реннин, который способствует свертыванию белков молока и таким образом удерживает их в желудке, что необходимо для действия пепсина. У взрослого человека функцию реннина выполняет химотрипсин панкреатического сока. В двенадцатиперстной кишке трипсин и химотрипсин быстро гидролизуют пептиды и некоторые нативные белки до простых пептидов и аминокислот.

Пепсин, трипсин и химотрипсин выделяются слизистой оболочкой желудка и поджелудочной железой в форме зимогенов (пепсиноген, трипсиноген и химотрипсиноген), по-видимому, чтобы предотвратить переваривание ими белков тех клеток, которые их вырабатывают.

Расщепление пептидов до аминокислот завершают карбоксипептидаза панкреатического сока и ряд ферментов кишечного сока (аминотрипептидаза, лейцинаминопептидаза, глицилглициндипептидаза, пролидаза, аминоксипептидаза и другие).

Аминокислоты и относительно простые полипептиды, образующиеся при переваривании белков пищи, всасываются главным образом в кровеносные капилляры слизистой оболочки кишечника. С кровью воротной вены они направляются в печень, откуда впоследствии распределяются между остальными частями организма. Механизм всасывания аминокислот мало изучен. Возможно, что резорбция аминокислот происходит при участии пиридоксала.

Углеводы пищевых продуктов представлены преимущественно крахмалом, гликогеном и дисахаридами — сахарозой, мальтозой и лактозой. Крахмал и гликоген гидролизуются до мальтозы под действием слюнной и панкреатической амилаз в полости рта и в тонких кишках. Ацетальные связи в молекулах дисахаридов подвергаются в желудке частичному неферментативному гидролизу соляной кислотой. Большая часть дисахаридов расщепляется на поверхности микроворсинок клеток слизистой оболочки кишечника с помощью дисахараз кишечного сока (α -глюкозидазы,

Т а б л и ц а 20. Состав пищеварительных соков

Пищеварительный сок	рН	Неорганические ионы	Ферменты				Другие вещества
			белкового обмена	углеводного обмена	липидного обмена	обмена нуклеиновых кислот	
Слюна	5,6—7,6	Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cl^- , HCO_3^- , H_2PO_4^-	—	α -Амилаза, мальтаза	—	—	Муцин, глобулин, холестерин, креатинин, аминокислоты, мочевина, мочевая кислота, аммиак
Желудочный сок	1,5—1,8	H^+ , Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cl^- , HCO_3^-	Пепсиноген, желатиназа	—	Липаза	—	Муцин
Панкреатический сок	8,6—9,0	Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cl^- , HCO_3^- , H_2PO_4^-	Трипсиноген, химотрипсиноген, карбоксипептидаза, аминопептидаза	Амилаза, лактаза	Липаза	Рибонуклеаза, дезоксирибонуклеаза	Инсулин
Кишечный сок							
сок тонкого кишечника	5,07—7,07	Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Cl^- , HCO_3^-	Аминогипептидаза, аминопептидаза, пролин-даза, лейцин-аминопептидаза, дипептидазы	α -Глюкозидаза, β -фруктофуранозидаза, β -галактозидаза	Липаза, лецитиназа	Нуклеазы	—
сок толстого кишечника	6,1—7,3						
Желчь	5,6—8,5	Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Cl^- , HCO_3^-	—	—	—	—	Желчные кислоты, желчные пигменты, жирные кислоты, холестерин, лецитин и другие фосфолипиды

ных триглицеридов, диглицеридов, моноглицеридов и солей жирных кислот.

Резорбция триглицеридов происходит после их эмульгирования под действием солей желчных кислот, моноглицеридов и солей жирных кислот. Эмульгированные триглицериды всасываются ворсинками кишечника и поступают в лимфатические сосуды. Небольшое количество триглицеридов, преимущественно глицериды жирных кислот с короткими углеводородными цепочками, поступает в кровь.

Большая часть всех всосавшихся и ресинтезированных липидов поступает в лимфатические сосуды и затем в кровь, меньшая часть — непосредственно в кровяное русло. Током крови липиды переносятся в печень, к периферическим тканям и в жировое депо, где происходят процессы промежуточного обмена. Посредством крови происходит постоянный обмен липидами между отдельными органами. Транспортными формами липидов являются липопротеины и фосфатиды.

Гидролиз нуклеиновых кислот до моно- и олигонуклеотидов происходит в желудочно-кишечном тракте при участии ферментов рибонуклеазы и дезоксирибонуклеазы, которые содержатся в соке поджелудочной железы (о структуре и свойствах этих ферментов см. кн. I). Дальнейшее расщепление моно- и олигонуклеотидов осуществляется под действием ряда ферментов кишечного сока (например, 5'-рибонуклеотид-фосфогидролазы, фосфодиэстеразы, фосфомоноэстеразы). В слизистой кишечника содержится активный фермент 5'-рибонуклеотид-фосфогидролаза (5'-нуклеотидаза), гидролизующая 5'-рибонуклеотиды на нуклеозиды и фосфорную кислоту. Под действием 5'-рибонуклеотид-фосфогидролазы происходит, по-видимому, гидролиз 5'-рибонуклеотидов на поверхности слизистой оболочки кишечника. Образующиеся при этом нуклеозиды легко всасываются через клеточные мембраны. В клетках кишечных стенок нуклеозиды расщепляются до пентоз и пуриновых или пиримидиновых оснований. Продукты полного гидролиза нуклеиновых кислот поступают с кровью в печень и другие ткани организма, где происходит биосинтез новых нуклеиновых кислот, а также дальнейшие процессы расщепления. В результате промежуточного обмена в организме человека пуриновые основания превращаются в мочевую кислоту, а пиримидиновые основания дают CO_2 , NH_3 , β -аланин и β -аминоизомасляную кислоту.

Растворенные в воде соли натрия, калия и кальция в виде хлоридов или фосфатов всасываются преимущественно в тонких кишках. Скорость всасывания этих солей зависит от их содержания в организме. Например, при понижении содержания кальция в крови всасывание его происходит значительно быстрее, чем в норме.

ЛОКАЛИЗАЦИЯ ПРОЦЕССОВ ПРОМЕЖУТОЧНОГО ОБМЕНА В КЛЕТКАХ

Процессы промежуточного обмена веществ происходят главным образом в клетках и связаны со строго определенными структурами клеток (краткое представление о структуре клеток дано в кн. I, стр. 7—14). В органеллах клеток локализованы ферменты, ферментные системы, субстраты, активаторы и ингибиторы. Так, мембрана эндоплазматической сети включает ферменты, катализирующие биосинтез фосфолипидов, стероидов, полисахаридов, а также реакции гидроксилирования алифатических и ароматических аминов и других соединений. В цитоплазматической жидкости находятся ферменты, участвующие в активации

аминокислот, и ферментная система гликолиза. В рибосомах и ядре содержатся ферменты биосинтеза белков. В микротельцах локализованы оксидазы аминокислот и каталаза, а у растений — ферменты глиоксилатного цикла (см. стр. 401).

Большой интерес с точки зрения обмена веществ представляют митохондрии (см. кн. I, стр. 9). Митохондрии содержат ферменты цикла лимонной кислоты, системы β -окисления жирных кислот, дыхательной цепи и окислительного фосфорилирования, пируватдегидрогеназный комплекс — мультиферментную систему, катализирующую окисление пирувиноградной кислоты до ацетил-КоА, и другие ферменты [9]. Локализация ферментных систем в митохондриях показана ниже:

Наружная мембрана

Цитохром b_5 , НАД-Н : цитохром b_5 — редуктаза (цитохром b_5 — редуктаза), моноаминоксидаза, кинуренин-3-гидроксилаза, АТФ-зависимая ацил-КоА — синтетаза, система удлинения цепи жирных кислот (C_{14} , C_{16}), глицерофосфат — ацилтрансфераза, лизофосфатид — ацилтрансфераза, лизолецитин — ацилмутаза, холинфосфотрансфераза, фосфолипаза A_2 , фосфатидатфосфатаза, нуклеозиддифосфаткиназа

Межмембранное пространство

Аденилаткиназа, нуклеозиддифосфаткиназа, креатинкиназа

Внутренняя мембрана

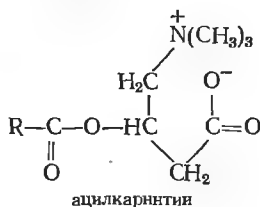
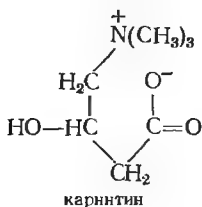
Цитохромы (a , a_3 , b , c , c_1), НАД- H_2 -дегидрогеназа, сукцинатдегидрогеназа, 3-оксипутиратдегидрогеназа, ацил-КоА-дегидрогеназа, система удлинения цепи жирных кислот (C_{10}), глицерофосфатдегидрогеназа, холиндегидрогеназа, ацил-КоА : карнитин — О-ацилтрансфераза, НАДФ-трансгидрогеназа, феррохелатаза

Матрикс

Пируваткиназа, НАДФ-зависимые дегидрогеназы, другие ферменты цикла Кребса, 3-оксиацил-КоА — дегидрогеназа, АТФ-зависимая ацил-КоА — синтетаза; ГТФ-зависимая ацил-КоА — синтетаза, нуклеозидмонофосфаткиназа, цитруллинсинтетаза, трансаминазы, система синтеза белка

Мембраны, в которых локализованы ферменты дыхательной цепи и окислительного фосфорилирования, называют сопрягающими мембранами. Примерами таких мембран являются внутренняя мембрана митохондрий, клеточная мембрана аэробных бактерий с дыхательным типом энергетике, хроматофоры фотосинтезирующих бактерий и мембраны тилакоидов хлоропластов зеленых растений. Отличительным признаком сопрягающих мембран является их способность образовывать АТФ за счет энергии внешних ресурсов.

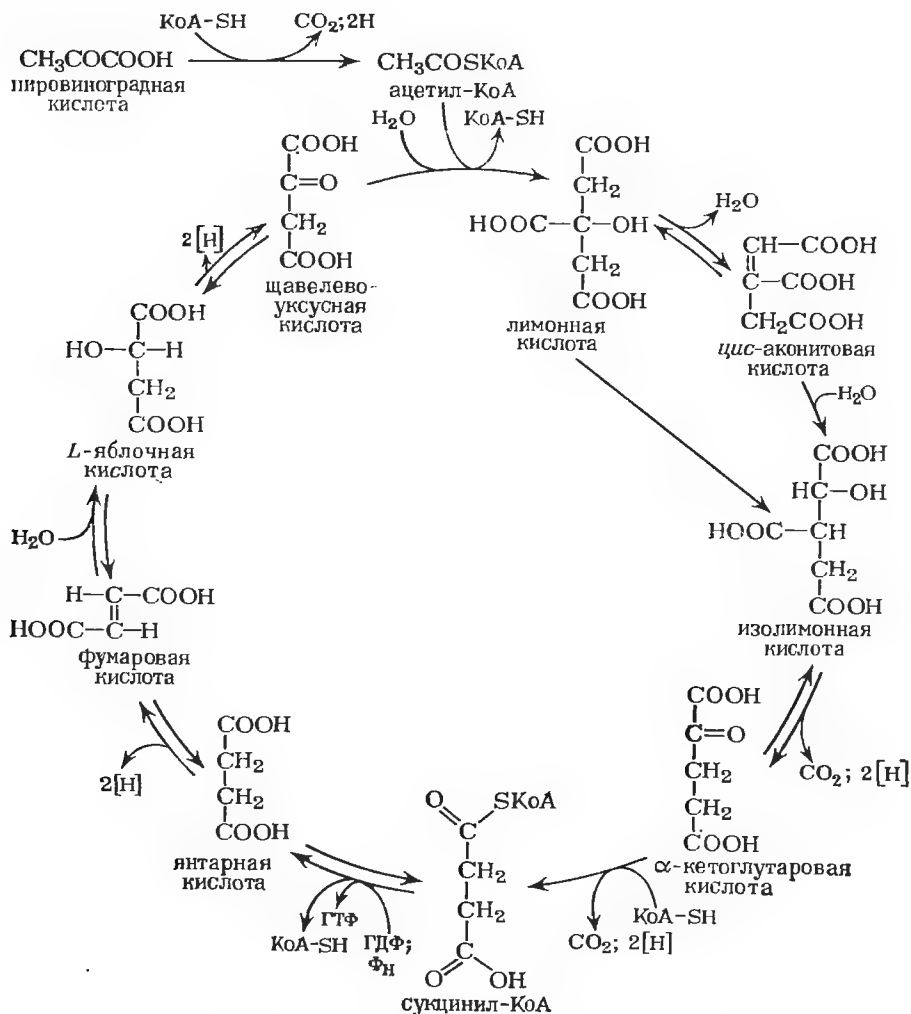
В последние годы доказано присутствие в митохондриях переносчиков аминокислот, ди- и трикарбоновых кислот, адениннуклеотидов. С участием переносчиков гликопротеидной природы, по-видимому, осуществляется транспорт Ca^{2+} и других двухвалентных катионов через митохондриальные мембраны. В переносе жирных кислот внутрь митохондрий, где происходит β -окисление, принимает участие карнитин



выполняющий роль транспортера ацильных групп во внутренней митохондриальной мембране [9]. Через мембрану митохондрий проникает либо экзогенный ацилкарнитин, либо ацилкарнитин, образующийся при переносе ацильного остатка с ацил-КоА на карнитин при участии ацил-КоА : карнитин—О-трансферазы.

ЦИКЛ ЛИМОННОЙ КИСЛОТЫ

Цикл лимонной кислоты (цикл трикарбоновых кислот или цикл Кребса) [9] представляет собой систему, осуществляющую полное окисление ацетил-КоА до CO_2 :



Ацетил-КоА получается в митохондриях при окислительном декарбоксилировании пировиноградной кислоты (см. кн. I, стр. 281, 283). В процессе участвует ферментный комплекс, включающий пироватдекарбоксилазу (4.1.1.1.), липоилредуктазу, ацетил-КоА : дегидролипид—S-ацетилтрансферазу (липоат—ацетилтрансфераза, 2.3.1.12), восстанов-

ленный НАД : липоамид—оксидоредуктазу (липоамид-дегидрогеназа, 1.6.4.3).

Пировиноградная кислота образуется в цитоплазме в результате расщепления углеводов, глицерина и некоторых аминокислот (*L*-аланин, *L*-серин, *L*-цистеин, *L*-метионин и *L*-глицин). Жирные кислоты и ряд аминокислот (*L*-лейцин, *L*-изолейцин, *L*-лизин) непосредственно превращаются в ацетил-КоА.

Первая стадия цикла Кребса представляет собой практически необратимую реакцию конденсации ацетил-КоА и щавелевоуксусной кислоты под действием цитрат—оксалоацетат-лиазы (цитрат-синтазы, 4.1.3.7). При этом образуется лимонная кислота и освобождается молекула кофермента А (механизм процесса см. кн. I, стр. 271).

При участии фермента цитрат(изоцитрат)—гидро-лиазы (аконитат-гидратаза; аконитаза, 4.2.1.3) лимонная кислота превращается в изолимонную кислоту через стадию образования *цис*-аконитовой кислоты. Кофактором фермента служат ионы Fe^{2+} , которые, по-видимому, функционируют в фермент-металл-субстратном комплексе. Аконитаза является одновременно гидратазой и изомеразой. Этот фермент способен отщеплять гидроксильную группу от третичного (дегидратация лимонной кислоты) и вторичного атомов углерода (дегидратация изолимонной кислоты).

На следующей стадии цикла Кребса происходит окисление изолимонной кислоты с образованием α -кетоглутаровой кислоты под действием изоцитрат : НАД-оксидоредуктазы (декарбоксилирующей) (изоцитратдегидрогеназа, 1.1.1.41).

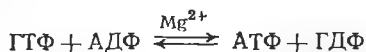
В результате окислительного декарбоксилирования под действием оксоглутаратдегидрогеназы α -кетоглутаровая кислота превращается в янтарную кислоту. Окисление α -кетоглутаровой кислоты протекает в две стадии. На первой стадии происходит окислительное декарбоксилирование α -кетоглутаровой кислоты с образованием сукцинил-КоА. Механизм процесса аналогичен окислительному декарбоксилированию пировиноградной кислоты.

α -Кетоглутаратдегидрогеназный комплекс представляет собой следующую систему ферментов: кетоглутарат—дегидрогеназа (1.2.4.2), липоилредуктаза, восстановленный НАД : липоамид-оксидоредуктаза (липоамид-дегидрогеназа, 1.6.4.3) и транссукцинилаза. Ферментный комплекс содержит шесть молекул связанной с белком липоевой кислоты, восемь молекул ФАД и шесть молекул тиаминпирофосфата.

На следующей стадии цикла Кребса, катализируемой сукцинат : КоА-лигазой (ГДФ) (сукцинил-КоА—синтетаза, сукцинаттиокиназа, 6.2.1.4) или сукцинил-КоА—гидролазой (3.1.2.3) при участии ионов Mg^{2+} , энергия тиоэфирной связи молекулы сукцинил-КоА переносится на гуанозиндифосфат или инозиндифосфат.



Под действием нуклеозиддифосфаткиназы энергия ГТФ (или ИТФ) накапливается в АТФ:



Эта стадия цикла Кребса является примером образования «макроэргической» связи на уровне субстрата путем реакций, в которых не участ-

вует система переноса электронов (так называемое субстратное фосфорилирование).

Дегидрирование янтарной кислоты до фумаровой кислоты катализирует сукцинат : (акцептор)—оксидоредуктаза (сукцинатдегидрогеназа, 1.3.99.1). Этот фермент, выделенный из сердца и дрожжей, имеет молекулярную массу 200 000, содержит четыре атома негемного железа и в качестве кофактора — производное флавина, природа которого окончательно не установлена.

Обратимую реакцию взаимопревращения фумаровой и *L*-яблочной кислот осуществляет фермент *L*-малат—гидро-лиаза (фумарат-гидратаза; фумараза, 4.2.1.2). Этот фермент с молекулярной массой $2,2 \cdot 10^5$ состоит из четырех одинаковых полипептидных субъединиц. Реакция стереоспецифична в обоих направлениях; присоединение и отщепление воды происходит только в *транс*-конформации, что было показано в опытах с D_2O .

Цикл Кребса завершается окислением *L*-яблочной кислоты в щавелевоуксусную кислоту под действием специфического фермента *L*-малат : НАД—оксидоредуктазы (малатдегидрогеназа, 1.1.1.37), коферментом служит НАД. В клетках млекопитающих найдены две изоформы этого фермента, одна из которых локализована в митохондриях.

Таким образом, за один цикл лимонной кислоты происходит окисление одной молекулы ацетил-КоА или одной молекулы пировиноградной кислоты до CO_2 . Коферменты, восстановленные в цикле Кребса, окисляются в дыхательной цепи.

Цикл лимонной кислоты занимает центральное место в многочисленных биосинтетических процессах. Большинство живых организмов синтезирует углеводы из ди- и трикарбоновых кислот, образовавшихся в цикле Кребса, или из соединений, которые могут превращаться в промежуточные продукты этого цикла (биосинтез углеводов см. стр. 64). В биосинтезе липидов (см. гл. «Липиды и липопротеиды») важнейшим промежуточным соединением является ацетил-КоА. Процесс биосинтеза жирных кислот начинается с конденсации ацетил-КоА с щавелевоуксусной кислотой.

Цикл Кребса является поставщиком α -кетокислот (щавелевоуксусной, α -кетоглутаровой и пировиноградной), которые служат предшественниками заменимых аминокислот у животных и большинства аминокислот у растений и микроорганизмов.

Биосинтез пуринов и пиримидинов (см. кн. I, гл. «Нуклеиновые кислоты и нуклеопротеиды»), входящих в состав нуклеиновых кислот и нуклеотидных коферментов, также тесно связан с циклом Кребса: углеродный скелет пиримидинов образуется из *L*-аспарагиновой кислоты, а атомы азота пуринов — из *L*-аспарагиновой и *L*-глутаминовой кислот, которые в свою очередь получают из щавелевоуксусной и α -кетоглутаровой кислот.

Исходным соединением в биосинтезе порфиринов (см. гл. «Хромопротеиды») является сукцинил-КоА.

У микроорганизмов (например, у *E. coli* и *Pseudomonas*), водорослей и высших растений цикл лимонной кислоты заменен глиоксилатным циклом, с помощью которого липиды и двууглеродные метаболиты (в частности, ацетил-КоА) превращаются в углеводы. В клетках животных отсутствуют два ключевых фермента этого цикла — изоцитрат-лиаза (4.1.3.1) и малат-синтаза (4.1.3.2), поэтому глиоксилатный цикл осуществляться не может.

ДЫХАТЕЛЬНАЯ ЦЕПЬ И ОКИСЛИТЕЛЬНОЕ ФОСФОРИЛИРОВАНИЕ

Дыхательная цепь. Цикл Кребса функционально связан с дыхательной цепью, которая представляет собой ряд окислительно-восстановительных ферментов, осуществляющих перенос водорода и электронов от субстрата к кислороду. Кислород для реакции окисления поступает в организм из воздуха через легкие. В легких он образует лабильное соединение с переносчиком кислорода — гемоглобином. По кровеносному руслу оксигемоглобин попадает в ткани, обедненные кислородом, где легко диссоциирует. Через стенки капилляров кислород диффундирует в клетки, где и участвует в реакциях окисления.

В процессе переноса водорода от органических субстратов к молекулярному кислороду принимают участие три основные группы окислительно-восстановительных ферментов.

1. Оксидоредуктазы, для которых коферментом служит никотинамидадениндинуклеотид (НАД) или никотинамидадениндинуклеотидфосфат (НАДФ).

2. Оксидоредуктазы, у которых роль простетических групп играют флавинадениндинуклеотид (ФАД) или флавинаденинмонопнуклеотид (ФМН).

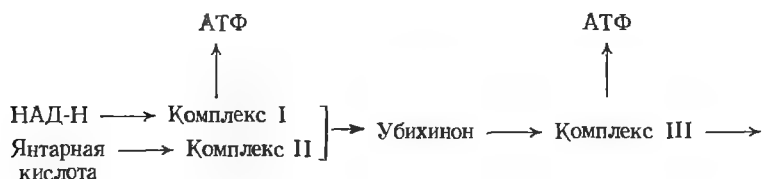
3. Цитохромы — оксидоредуктазы, содержащие в качестве простетической группы железные комплексы различных порфиринов.

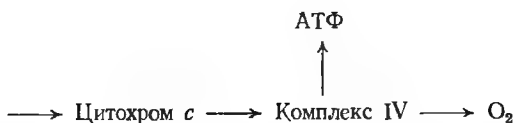
Ферментные системы этих сложных биохимических окислительно-восстановительных реакций и окислительного фосфорилирования требуют высокой степени пространственной организации, они должны быть строго фиксированы в клеточных структурах в определенной последовательности, в которой они функционируют в дыхательной цепи.

Ферменты дыхательной цепи и окислительного фосфорилирования локализованы во внутренней мембране митохондрий и функционируют в форме высокоорганизованных комплексов.

Строение элементарной частицы, переносящей водород и электроны, окончательно не установлено. Однако показано, что она имеет сложную структуру и состоит из четырех комплексов (I, II, III и IV). Все комплексы были выделены и установлено, что для них характерна структурно-функциональная комплементарность, которая выражается в их способности к самосборке в замкнутые мембранные образования, катализирующие перенос водорода и электронов между соседними комплексами, вплоть до реконструкции функционирующей дыхательной цепи [8].

Комплексы I и II выполняют одну и ту же функцию — передачу водорода и электронов на комплекс III. Дыхательная цепь начинается с комплекса I, если электроны поступают от кофермента НАД-Н, и с комплекса II, если донором водорода служит янтарная кислота (один из продуктов цикла Кребса). От комплекса III водород и электроны переходят к комплексу IV и, в конечном счете, на молекулу кислорода:





В комплексы входят белки-ферменты, катализирующие перенос водорода и электронов, белки, выполняющие структурные функции, и фосфолипиды. Расположение каталитических белков в комплексах определяется последовательностью окислительно-восстановительных реакций в дыхательной цепи.

В элементарной единице, как и в самих комплексах, каталитические белки — оксидоредуктазы располагаются в порядке увеличения их окислительно-восстановительных потенциалов [8] (см. стр. 406).

Каждый комплекс содержит несколько оксидоредуктаз, которые расположены в строгой последовательности, обеспечивающей плавное повышение положительных потенциалов и передачу электронов от одного фермента к другому. Разница в потенциалах между двумя соседними оксидоредуктазами очень незначительна, что обеспечивает обратимость реакций.

При окислении НАД-Н(+Н⁺) молекулярным кислородом происходит изменение потенциала приблизительно на 1,2 В. В зависимости от потенциала окисления субстрата (карбоновые кислоты цикла Кребса) первыми акцепторами водорода являются НАД⁺ или НАДФ⁺, ФАД или липоевая кислота. Так, например, потенциал окисления изолимонной и яблочной кислот около 0,3 В. В этом случае реакция дегидрирования протекает при участии оксидоредуктаз, коферментом которых служит НАД⁺. Потенциал окисления янтарной кислоты около 0. Первичным акцептором водорода в реакции дегидрирования янтарной кислоты являются флавинсодержащие ферменты с потенциалом около 0,1 В. Этим объясняется отличие пути окисления янтарной кислоты от других карбоновых кислот цикла Кребса. Водород, минуя НАД⁺, восстанавливает ФАД, а затем через те же самые переносчики транспортируется к кислороду [9].

В комплекс I входит дегидрогеназа восстановленного НАД (флавопротеид, ФП₁) и белки, которые содержат негемное железо (2—8 атомов железа на молекулу) и остатки цистеина, специфическим образом связанные с железом. В комплекс II также входят флавопротеид (сукцинатдегидрогеназа, ФП₂) и белки, содержащие негемное железо. Дегидрогеназа восстановленного НАД и сукцинатдегидрогеназа по молекулярной структуре и механизму действия сходны между собой. Оба эти фермента относятся к высокомолекулярным белковым комплексам.

Комплексы I и II являются началом дыхательной цепи и направляют электроны на один и тот же ее участок. Роль переносчика водорода и электронов между комплексами I и II и цитохромной системой выполняет убихинон (кофермент Q). Предполагают, что убихинон принимает атомы водорода от комплексов I и II и передает их на комплекс III, т. е. является связующим звеном между этими комплексами. Однако вопрос о роли кофермента Q в процессе переноса водорода и электронов не ясен. Убихинон и родственные ему соединения обнаружены не только в митохондриях, но и в клеточных ядрах и микросомах.

В состав комплекса III входят цитохромы *b* и *c*₁. Молекулярная масса цитохрома *b* 28 000, простетической группой является гем, координационно связанный с белком. Молекулярная масса цитохрома *c*₁ 40 000; группа гема соединена с белком двумя ковалентными тиоэфирными свя-

зиями. Комплекс III осуществляет перенос электронов с восстановленного убинона на цитохром *c*.

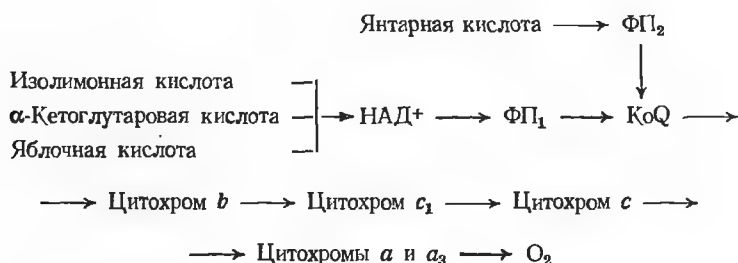
Цитохром *c* отличается от всех цитохромов дыхательной цепи тем, что он легко экстрагируется из митохондрий. Молекулярная масса цитохрома *c* 12 000. Железопорфириновая протетическая группа соединена с белком ковалентно, так же, как в цитохроме *c*₁. Предполагают, что цитохром *c*, как и кофермент Q, выступает в качестве связующего звена между комплексами III и IV.

Комплекс IV — концевой компонент дыхательной цепи — содержит цитохромоксидазу, представляющую собой комплекс, который состоит из цитохромов *a* и *a*₃. Комплекс IV в восстановленной форме непосредственно реагирует с молекулярным кислородом. Цитохромы *a* и *a*₃ прочно связаны с митохондриальной структурой. Цитохромоксидаза прочно связана также с кардиолипином, который удаляется при экстракции только в жестких условиях. Отщепление кардиолипина приводит к потере цитохромоксидазной активности. Препараты цитохромоксидазы содержат и другие липиды. Предполагают, что фосфолипиды способствуют взаимодействию цитохрома *c* с цитохромоксидазой.

Структура цитохромоксидазы — сложного и важного в функциональном отношении концевой комплекса дыхательной цепи — окончательно не установлена. В очищенном препарате цитохромоксидазы обнаружены атомы меди. Показано, что при переносе электронов на кислород происходит окисление Cu⁺ до Cu²⁺. Предполагают, что в цитохромоксидазе атомы меди также участвуют в ферментативных процессах, связанных с переносом электронов на кислород.

Протетические группы цитохромов *a* и *a*₃ (см. раздел «Хромопротеиды») близки по структуре, но значительно отличаются от протогема, входящего в цитохром *b*, и от производных протогема, обнаруженных в цитохромах *c*₁ и *c*.

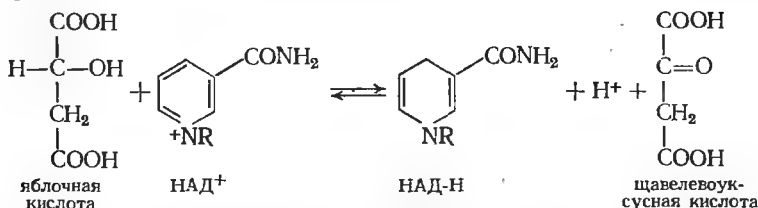
Дыхательную цепь схематично можно представить следующим образом:



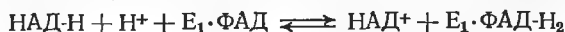
Реакции дегидрирования в цикле Кребса катализируются ферментами оксидоредуктазами. Эти ферменты обладают высокой степенью специфичности, поэтому для каждого окисляемого субстрата (пировиноградная, изолимонная, α -кетоглутаровая, янтарная и яблочная кислоты) имеется соответствующая оксидоредуктаза. Все оксидоредуктазы за исключением сукцинатдегидрогеназы содержат в качестве кофермента НАД⁺.

Водород, отщепляясь от субстратов — карбоновых кислот, являющихся промежуточными соединениями в цикле Кребса, переносится на

НАД⁺ или НАДФ⁺ соответствующей оксидоредуктазы, НАД⁺ или НАДФ⁺ при этом восстанавливаются:



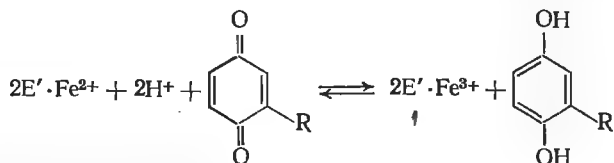
Восстановленный никотинамидадениндинуклеотид и янтарная кислота доставляют водород комплексам I и II, при этом протестические группы дегидрогеназы восстановленного НАД и сукцинатдегидрогеназы — флавинодениндинуклеотиды (ФАД) — восстанавливаются:



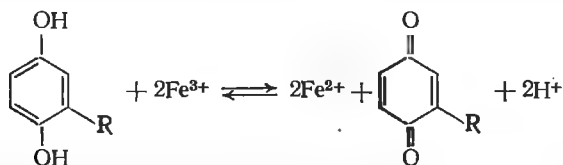
Оба восстановленных флавопротеида передают водороды белкам, содержащим негемное железо:



Затем электроны и протоны поступают к общему акцептору КоQ, который представляет собой производное бензохинона с длинной изопреноидной боковой цепью, способное легко окисляться и восстанавливаться:



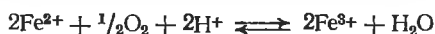
При окислении убинона в дыхательной цепи происходит перенос электронов на цитохром *b*, а протоны поступают в клеточную среду. При этом в цитохроме *b* атом трехвалентного железа протестической группы гема восстанавливается до двухвалентного:



От цитохрома *b* электрон переносится к цитохрому *c*₁. При этом железо протестической группы цитохрома *c*₁ восстанавливается, а железо протестической группы цитохрома *b* переходит в окисленную форму.

Аналогично протекают последующие стадии переноса электрона с цитохрома *c*₁ на цитохром *c*, с цитохрома *c* на цитохром *a* и с цитохрома *a* на цитохром *a*₃.

На последней стадии дыхательной цепи молекулярный кислород активируется, получая электроны от цитохрома *a*₃, и взаимодействует с протонами, находящимися в клеточной среде, образуя молекулу воды; железо протестической группы цитохрома *a*₃ при этом переходит в окисленную форму:



В описанной схеме дыхательной цепи показаны основные этапы и основные участники процесса переноса водорода и электронов. Необходимо отметить, что кроме перечисленных промежуточных участников окислительно-восстановительных процессов в цепи клеточного дыхания определенную роль играют переносчики, содержащие негемное железо и медь.

Окислительное фосфорилирование. При протекании многостадийных окислительных реакций в дыхательной цепи происходит дробное выделение энергии окисляющегося субстрата. Различают два вида окисления — сопряженное фосфорилирующее и сопряженное нефосфорилирующее. При сопряженном фосфорилирующем окислении в клетке накапливается выделяющаяся при окислении энергия в виде АТФ. При сопряженном нефосфорилирующем окислении энергия, выделяющаяся в дыхательной цепи, используется клеткой для выполнения работы (перенос ионов через мембрану митохондрий, изменение конформации митохондриальной структуры и др.) [9].

Процесс образования АТФ из АДФ и неорганического фосфата в дыхательной цепи за счет энергии окисления называется окислительным фосфорилированием.

Установлено, что при прохождении пары электронов от восстановленной формы НАД к кислороду синтезируются три молекулы АТФ, а при прохождении пары электронов от янтарной кислоты к кислороду — две молекулы АТФ.

Показано, что окисление сопряжено с фосфорилированием на определенных участках дыхательной цепи, а именно между НАД и флавопротеидом, между цитохромом *b* и цитохромом *c* и между цитохромом *c* и кислородом. Последовательность расположения этих участков дыхательной цепи согласуется также с известными значениями окислительно-восстановительных потенциалов пар переносчиков [10]:

Переносчик	E_0 , В	ΔE_0 , В
НАД	-0,32	0,27
Флавопротеид	-0,05	
Цитохром <i>b</i>	+0,04	0,09
Цитохром <i>c</i>	+0,26	
Цитохром <i>a</i>	+0,29	0,22
Кислород	+0,82	
		0,03
		0,53

Механизм окислительного фосфорилирования, сопряженного с переносом электронов, окончательно не установлен. Для его объяснения предложен ряд гипотез (см. стр. 425).

НЕКОТОРЫЕ ВОПРОСЫ МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЭНЕРГЕТИКИ

Среди примечательных свойств живых организмов к особо важным следует отнести их способность извлекать из окружающей среды и преобразовывать энергию, которая необходима для построения и поддержания сложной структурной организации, свойственной всему живому.

Превращение энергии в живой клетке подчиняется тем же законам термодинамики, которые действуют в неживой природе. Согласно первому закону термодинамики, живые организмы не могут ни создать, ни уничтожить энергию, они могут лишь преобразовать одну форму энергии в другую. Клетка представляет собой термодинамически открытую систему, обменивающуюся с внешней средой, которая служит для клетки

поставщиком энергии и строительного материала. Особенностью открытых систем является то, что они не находятся в равновесии с внешней средой. Живые организмы — это также неравновесные открытые системы, но для них характерно стационарное состояние, т. е. такое состояние, при котором скорость переноса веществ и энергии из среды в систему точно уравновешена скоростью переноса веществ и энергии из системы в среду.

Соответственно второму закону термодинамики, самопроизвольно протекающие процессы (физические, химические) стремятся идти в направлении, соответствующем возрастанию неупорядоченности системы и окружающей среды (меру разупорядоченности системы для данного момента времени называют энтропией) [3, 10—13].

Клетка на протяжении многовековой эволюции органического мира совершенствовала свои уникальные молекулярные механизмы преобразования энергии, которые эффективно действуют в мягких условиях: низкая и приблизительно одинаковая для всех частей клетки температура (живая клетка — изотермическая система) и давление, разбавленные среды, незначительные колебания pH среды и т. д. Затем организмы возвращают в окружающую среду эквивалентное количество энергии обычно в форме тепла и других бесполезных для клетки форм энергии, что значительно снижает степень упорядоченности внешней среды, повышая при этом ее энтропию [3].

Будучи изотермической системой, работающей при постоянном давлении, клетка не может использовать в качестве источника энергии тепло, ибо, согласно второму закону термодинамики, работа при постоянном давлении может совершаться только за счет перехода тепла из зоны с более высокой температурой в зону с более низкой температурой [3, 13]. Поэтому энергию, которую клетка поглощает из окружающей среды, она получает в форме химической энергии, заключенной в химических связях молекул питательных веществ (белки, углеводы, липиды), которые выполняют роль биологического топлива. Молекулы этих биополимеров в ходе распада претерпевают ряд превращений (см. стр. 392) прежде, чем произойдут основные процессы высвобождения энергии — реакции окисления, сопровождающиеся значительными изменениями энергии системы. Затем эта энергия преобразуется клеткой и используется для ее жизнедеятельности [7].

Совокупность механизмов получения энергии за счет внешних энергетических ресурсов и путей дальнейшего расходования ее клеткой при осуществлении многообразных жизненных функций составляет энергетический обмен клетки. В зависимости от источника энергии (или энергетического ресурса) различные клетки определенным образом организуют извлечение энергии, т. е. обладают вполне определенным, свойственным только этим клеткам типом энергетического обмена [3, 9—12].

Так, высокоорганизованные животные клетки являются органотрофами и используют «топливо» с высоким энергетическим потенциалом (молекулы биополимеров). В свою очередь эти сложные соединения синтезируют из более простых клетки зеленых растений, используя энергию солнечного света. Этот тип энергетического обмена называют фототрофным. Некоторые организмы, например бактерии, используют в качестве энергетического ресурса неорганические вещества и обладают неорганотрофным (или хемосинтетическим, литотрофным) типом энергетики.

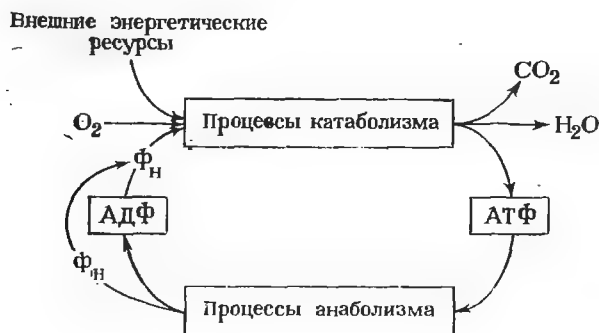
В зависимости от того, требует ли определенный тип энергетики наличия кислорода для расщепления энергетического субстрата, орнано-

трофный и неорганотрофный типы обмена классифицируют как аэробный (дыхательный) тип энергетического обмена (в роли окислителя выступает кислород) и анаэробный (гликолитический) тип энергетического обмена (в роли окислителя выступают другие вещества) [1, 7, 9, 12].

К органотрофному типу относится энергетический обмен животной клетки, который представлен как аэробным, так и анаэробным его разновидностями. Фототрофный и органотрофный (дыхательный и гликолитический) типы энергетики присущи зеленым растениям. Для микроорганизмов характерны все типы энергетического обмена или различные их сочетания.

Все живые организмы животного и растительного происхождения в конечном итоге получают энергию от солнца, однако растения получают ее непосредственно, а животные — косвенно.

Два класса живых клеток (фототрофы и органотрофы), получая энергию из внешней среды в различных формах в процессе окисления, накапливают и используют ее в одной форме — в виде аденозинтрифосфата (АТФ), который служит главным носителем химической энергии в клетках всех живых организмов. Следовательно, процесс высвобождения энергии должен быть обязательно сопряжен с синтезом АТФ из АДФ и неорганического фосфата (процесс фосфорилирования). При переносе концевой фосфатной группы АТФ на определенные акцепторные молекулы происходит перераспределение химической энергии АТФ, за счет которой совершается полезная работа в клетке (например, анаболические реакции, требующие затраты энергии, — механическая работа, биосинтез и др.), и вновь образуется АДФ. Энергетический цикл АТФ—АДФ в клетке можно представить [8] следующим образом:



Оба процесса трансформации энергии (окисление и фосфорилирование) протекают в так называемых сопрягающих мембранах (внутренние мембраны митохондрий и хлоропластов зеленых растений, хромофоров фотосинтезирующих бактерий, клеточная мембрана аэробных бактерий с дыхательным типом энергетики), где сосредоточены окислительно-восстановительные ферменты и коферменты*, катализирующие эти процессы [8, 9, 14] (см. т. I, стр. 247).

Энергия, трансформированная в мембране, может быть использована для совершения нескольких видов полезной работы и образования тепла

* Переносчиком электронов — носителей энергии окисления, превращающейся затем в энергию связей АТФ, служат коферменты, наиболее важными из которых являются НАД и НАДФ.

[3, 14]. В настоящее время окончательно не доказан еще один путь энергетического превращения — использование освобождающейся в мембране энергии для совершения механической работы [8, 14].

Центральной проблемой в изучении процессов трансформации энергии в клетке является механизм образования первичного высокоэнергетического продукта (интермедиата $X \sim Y$) [14], синтез которого непосредственно сопряжен с трансформацией энергии, освобождающейся при окислении. Предложено несколько гипотез для объяснения энергетического сопряжения [3, 14].

Химическая гипотеза предусматривает прямое использование химической энергии, освобождающейся при окислении, в химическую энергию предшественника АТФ. При этом не происходит промежуточного превращения химической энергии в какие-либо другие, нехимические формы энергии.

Механохимическая (конформационная) схема энергетического сопряжения предполагает использование химической энергии окисления сначала для совершения механической работы (например, создание напряженной конформации фермента, участвующего в переносе электронов), а затем использование этой энергии для синтеза высокоэнергетических соединений, в том числе и АТФ [14].

Хемиосмотическая (электрохимическая, электроосмотическая) гипотеза включает в качестве промежуточной стадии трансформацию энергии окисления в разность электрохимических потенциалов ионов водорода (H^+) на сопрягающей мембране.

Хемиосмотическая гипотеза энергетического сопряжения в живой клетке получила в последнее время много экспериментальных подтверждений. Эта гипотеза, которую многие специалисты называют уже теорией, не отрицает существования предшественника АТФ в системе окислительного фосфорилирования, но свойство унифицированной формы энергии относит к трансмембранному электрохимическому потенциалу ионов водорода H^+ ($\Delta\mu_{H^+}$). Таким образом, клетка имеет две формы унифицированной энергии — химическую в форме АТФ и энергию в форме мембранного потенциала. Через мембранный потенциал энергия окисления трансформируется затем в химическую работу (синтез АТФ, обратный перенос электронов в других местах энергетического сопряжения), в осмотическую работу (транспорт ионов против градиента через мембрану), в тепло. Главная же функция мембранного потенциала — сопряжение процессов окисления и фосфорилирования.

В выполнении всех функций по аккумуляции и трансформации энергии важную роль играют мембранные органеллы клетки [3, 8, 14].

ПРИНЦИПЫ ХИМИЧЕСКОЙ ТЕРМОДИНАМИКИ В ПРИЛОЖЕНИИ К БИОЛОГИЧЕСКИМ СИСТЕМАМ

Клетка представляет собой открытую систему и обменивается с внешней средой. При анализе энергетических процессов рассматривают начальные и конечные (возникшие после установления равновесия) состояния системы и окружающей среды. Количество энергии, соответствующее каждому из указанных состояний системы и зависящее от ряда параметров (температура, давление, объем и т. д.), может быть выражено уравнением состояния. Равновесие определяется как состояние, при котором не происходит суммарных изменений химических и физических характе-

ристик системы (температура, давление, концентрации составных частей постоянны). Система в состоянии равновесия не может совершать работу, ибо самопроизвольно она не может вернуться в исходное состояние, так как этот процесс потребовал бы изменения энтропии. Живая клетка никогда не достигает состояния равновесия, в каждый момент времени она находится в стационарном состоянии. Таким образом, стационарное состояние, в котором существуют все живые организмы, представляет собой наиболее упорядоченное состояние открытой системы, имеющее минимальную скорость возрастания энтропии. Процессы, протекающие без изменения энтропии, называют обратимыми, а процессы, при которых происходит возрастание энтропии, — необратимыми.

Руководствуясь правилами термодинамики, можно сделать анализ энергетических изменений системы, что дает возможность составить энергетический баланс. Изменение энтропии в процессах химических реакций довольно сложно измерить и вычислить, но его можно количественно связать с изменением общей энергии системы через третью функцию — свободную энергию (ΔG) с помощью уравнения, объединяющего оба закона термодинамики [8, 32]. Под свободной энергией понимают полезную форму энергии, утилизируемую клеткой, или энергию, способную преобразовываться в работу при постоянных температуре и давлении. При рассмотрении химических процессов свободную энергию представляют как химическую энергию, обеспечивающую протекание химической реакции [3, 7, 13, 15]. Поскольку изменение свободной энергии химической реакции может быть довольно легко измерено, можно составить уравнение изменения свободной энергии при постоянных температуре и давлении

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S$$

где ΔH — изменение энтальпии (теплосодержания) [3, 4], T — абсолютная температура, ΔS — изменение энтропии. Изменение энтальпии ΔH определяется из уравнения

$$\Delta H = \Delta E + \Delta PV$$

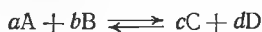
где ΔE — изменение общей энергии системы, P — давление, V — объем. Учитывая тот факт, что в биологических системах химические реакции протекают в разбавленных водных растворах, где температура, давление и объем остаются постоянными, ΔPV практически равен нулю, а следовательно, величину ΔH можно считать численно равной ΔE , т. е. изменению общей энергии системы:

$$\Delta G = \Delta E - T\Delta S \quad \text{или} \quad \Delta E = \Delta G + T\Delta S$$

Это означает, что изменение общей энергии системы ΔE (при постоянных температуре и давлении) численно равно теплосодержанию (или тепловому эффекту реакции) или равно сумме ΔG и $T\Delta S$. Отсюда следует, что изменение свободной энергии ΔG можно определить как часть общей энергии, которая может быть использована для выполнения любой работы системой, стремящейся к равновесию при постоянных температуре и давлении. Состоянию равновесия соответствует минимальное значение свободной энергии (но максимальное значение энтропии!). Если система претерпевает изменения, ведущие к установлению равновесия, то постоянной остается только общая энергия системы и окружающей среды. Энергия же самой системы может либо оставаться неиз-

менной, либо увеличиваться или уменьшаться. Это значит, что энтропия системы может увеличиваться, оставаться постоянной, и даже уменьшаться, но, согласно второму закону термодинамики, общая энтропия системы будет увеличиваться за счет соответствующих изменений энтропии окружающей среды. Сложность в определении изменения энтропии системы и окружающей среды делает целесообразным для предсказания направления химического процесса измерение изменения свободной энергии, которое при постоянных температуре и давлении служит характеристикой самой системы. Свободная энергия системы всегда уменьшается, никогда не возрастает и при равновесии равна минимальному значению [3, 13].

Изменение свободной энергии (ΔG) химической реакции определяется по уравнению, которое можно написать, исходя из закона химического равновесия для любой реакции



где a, b, c, d — число участвующих в реакции молекул A, B, C, D соответственно. Отсюда изменение свободной энергии равно

$$\Delta G = \Delta G^0 + RT \ln \frac{[C]^c [D]^d}{[A]^a [B]^b}$$

где $[A], [B], [C], [D]$ — мольные концентрации реагирующих веществ A, B, C, D; R — газовая постоянная, T — абсолютная температура и ΔG^0 — изменение стандартной свободной энергии. Для реакции в состоянии равновесия независимо от исходных концентраций веществ A, B, C, D свободная энергия минимальна и далее не меняется, т. е. $\Delta G = 0$. Подставляя это значение, а также величину константы равновесия реакции

$$K_p = \frac{[C]^c [D]^d}{[A]^a [B]^b}$$

в уравнение свободной энергии, получаем

$$\Delta G^0 + RT \ln K_p = 0, \quad \text{или} \quad \Delta G^0 = -RT \ln K_p$$

Следовательно, изменение стандартной свободной энергии является специфической термодинамической константой, характеризующей данную реакцию. Ее можно вычислить, если известно значение константы равновесия этой реакции при постоянной температуре. Изменение стандартной свободной энергии можно выразить и как разность между стандартной свободной энергией исходных и конечных веществ:

$$\Delta G^0 = (cG_C^0 + dG_D^0) - (aG_A^0 + bG_B^0)$$

Зная значение стандартной свободной энергии образования многих соединений, можно определить изменение стандартной свободной энергии химических реакций, в которых они участвуют.

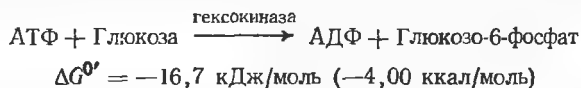
Необходимо отметить, что между изменением свободной энергии (ΔG) и изменением стандартной свободной энергии (ΔG^0) имеется существенное различие. Анализируя уравнения, рассмотренные ранее, можно видеть, что ΔG зависит от концентрации исходных и конечных веществ реакции, в то время как ΔG^0 для каждой определенной реакции при данной температуре является величиной постоянной. Значения величин ΔG и ΔG^0 численно равны только в том случае, если концентрация исходных и конечных веществ реакции составляет 1,0 М. Возможность протекания

химической реакции в данном направлении при данных концентрациях определяется только значением ΔG (оно должно быть отрицательным). Имеются реакции, для которых ΔG^0 — величина положительная, но если начальные концентрации исходных веществ таковы, что ΔG имеет отрицательный знак, то данная реакция будет протекать.

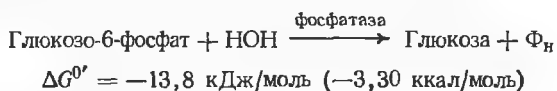
Значение ΔG^0 можно рассчитать, зная константу равновесия K_p (ее можно определить аналитическими измерениями). Для любой химической реакции, если $K_p=1$, то $\Delta G^0=0$, т. е. свободная энергия системы не изменяется. Если $K_p>1$, то ΔG^0 оказывается величиной отрицательной. В случае $K_p<1$ величина ΔG^0 будет положительной. Эти значения справедливы при условии, что концентрация реагирующих компонентов реакции равна 1,0 М. Химические реакции, для которых ΔG^0 — величина отрицательная, протекают самопроизвольно (концентрации компонентов реакции 1,0 М) и называются экзергоническими.

Необходимо также отметить, что в отличие от физической химии, где стандартному состоянию соответствует рН 0, в биологической энергетике в качестве стандартного принимается состояние при рН 7. При этом изменение стандартной свободной энергии обозначается $\Delta G^{0'}$.

Изменения стандартной свободной энергии химических реакций обладают свойством аддитивности, что очень важно для реакций, $\Delta G^{0'}$ которых имеет большую величину, измерение которой трудно произвести с достаточной точностью. Так, пользуясь аддитивностью величин $\Delta G^{0'}$ для последовательных реакций, можно рассчитать изменение стандартной свободной энергии гидролиза АТФ, равное $-30,5$ кДж/моль ($-7,3$ ккал/моль) (рН 7,0; 37°C ; в присутствии избытка ионов Mg^{2+}), представив реакцию гидролиза в две стадии. Сначала рассчитывают изменение стандартной свободной энергии реакции АТФ с глюкозой, определив предварительно ее константу равновесия ($K_p=661$):



Затем определяют константу равновесия ($K_p=171$) и изменение стандартной свободной энергии для реакции гидролиза глюкозо-6-фосфата:



Далее суммируют эти реакции



и определяют изменение стандартной свободной энергии ($\Delta G^{0'}$) реакции гидролиза АТФ:

$$\Delta G_{\text{АТФ}}^{0'} = \Delta G_1^{0'} + \Delta G_2^{0'} = -16,7 + -13,8 =$$

$$= -30,5 \text{ кДж/моль } (-7,3 \text{ ккал/моль})$$

Для отщепления концевой фосфатной группы АДФ при рН 7 изменение стандартной свободной энергии равно $-30,5$ кДж/моль. Реакция гидролиза фосфатной группы АМФ характеризуется низким значением $\Delta G^{0'}$, равным $-14,2$ кДж/моль ($-3,4$ ккал/моль).

В физиологических условиях живой клетки самопроизвольно (при ферментативном катализе) могут протекать только катаболические ре-

акции, характеризующиеся отрицательным значением ΔG . Однако в клетках имеют место многие процессы, для которых $\Delta G > 0$, например синтез каталитических и структурных белков из аминокислот, синтез полисахаридов из простых углеводов и т. д. Эти реакции требуют притока энергии. В мягких условиях биологических систем, где наиболее мощные источники энергии (повышение температуры, сильное изменение pH среды) абсолютно исключены, энергетические процессы, связанные с анаболическими превращениями, протекают только за счет сопряжения с экзергоническими процессами. Термодинамическое требование для такого рода сопряжений заключается в том, что в процессе экзергонической реакции должно освобождаться значительно больше энергии, чем это требуется для сопряженной с ней эндергонической реакции, и суммарное превращение должно быть экзергоническим. Это может выполняться в том случае, если энергия передается от одного соединения к другому посредством общего для обеих реакций химического соединения. Следовательно, сопряжение процессов делает термодинамически выгодным анаболические процессы в том случае, если в одно из реагирующих веществ введена такая дополнительная группа, с помощью которой образуется соединение с более высокой свободной энергией.

Если приобретенная таким образом энергия достаточна для того, чтобы изменение свободной энергии последующей реакции, в которой может освободиться эта же группа, стало отрицательным, то суммарное превращение будет термодинамически возможным, а при наличии определенного фермента может протекать самопроизвольно.

В живых системах в процессе эволюции произошел отбор присоединяющихся группировок, обеспечивающих возможность протекания реакций анаболического типа. В качестве такой группы функционирует фосфорильный остаток PO_3H_2 [15].

ВЫСОКОЭНЕРГЕТИЧЕСКИЕ СОЕДИНЕНИЯ

Соединения, у которых изменение стандартной свободной энергии гидролиза (ΔG^0) ниже, чем у АТФ ($\Delta G^0 = -30,5$ кДж/моль), часто относят к «высокоэнергетическим» соединениям. Соединения с более высоким значением ΔG^0 реакции их гидролиза, чем для АТФ, называют «низкоэнергетическими».

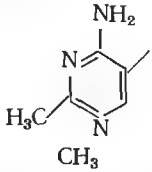
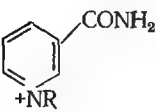
АТФ в термодинамической шкале изменений стандартной свободной энергии (ΔG^0) гидролиза фосфатов [3] занимает промежуточное положение. Наибольший интерес с энергетической точки зрения представляют высокоэнергетические соединения, выступающие как переносчики энергии в живых системах.

Класс богатых энергией соединений весьма обширен; в него входят фосфаты, тиоэфиры, ониеые соединения, имидазолы, основные представители которых приведены в табл. 21 [1, 7, 15—17].

Центральное место среди богатых энергией соединений занимают фосфаты: нуклеозидполифосфаты (пирофосфаты), амидинфосфаты, ацилфосфаты и енолфосфаты.

Все фосфаты, имеющие большее отрицательное значение стандартной свободной энергии гидролиза, чем АТФ, подразделяют на два класса: первые играют роль «аккумуляторов» энергии, сохраняя ее в форме энергии фосфатных связей, вторые образуются в процессе ферментативных реакций катаболизма. К первому классу относят нуклеозидполифос-

Таблица 21. Высокоэнергетические соединения

Общая формула	Отдельные представители	
	название	заместители
Пирофосфаты		
$\text{RO}-\overset{\text{O}}{\underset{\text{OH}}{\text{P}}}-\text{O}-\overset{\text{O}}{\underset{\text{OH}}{\text{P}}}-\text{OH}$	АТФ, АДФ ГТФ, ГДФ ЦТФ, ЦДФ УТФ, УДФ	Аденозил Гуанозил Цитозил Уридил
Амидинфосфаты (фосфогены)		
$\begin{array}{c} \text{R} \\ \diagup \\ \text{N} \\ \diagdown \\ \text{R}' \end{array} - \text{C} = \text{NH} - \text{NH} - \overset{\text{O}}{\underset{\text{OH}}{\text{P}}} - \text{OH}$	N-Фосфокреатин N-Фосфоаргинин	$\text{R} = \text{CH}_2\text{COOH}, \text{R}' = \text{CH}_3$ $\text{R} = \text{H}_2\text{NCH}(\text{CH}_2)_4, \text{R}' = \text{H}$ COOH
Ацилфосфаты		
$\text{R}-\overset{\text{O}}{\underset{\text{O}}{\text{C}}}-\text{O}-\overset{\text{O}}{\underset{\text{OH}}{\text{P}}}-\text{OH}$	1,3-Дифосфоглицериновая кислота Ацетилфосфат	$-\text{CHCH}_2\text{OP}(\text{OH})_2$ $\text{OH} \quad \text{O}$ $-\text{CH}_3$
Тиоэферы		
RCOSR'	Ацетил-КоА	$\text{CH}_3, \text{КоА}$
Енолфосфаты		
$\text{R}-\text{O}-\overset{\text{O}}{\underset{\text{OH}}{\text{P}}}-\text{OH}$	2-Фосфоенолпировиноградная кислота	$-\text{C}=\text{CH}_2$ COOH
Сульфониевые соединения		
$\text{RCH}_2-\overset{+}{\text{S}} \begin{array}{l} \diagup \text{R}' \\ \diagdown \text{R}'' \end{array}$	«Активный метионин»	$\text{R} = \text{Аденозил},$ $\text{R}' = (\text{CH}_2)_2\text{CHCOOH}, \text{R}'' = \text{CH}_3$ NH_2
Четвертичные аммониевые соединения		
$\text{R}_3\text{N}^+-\text{CH}_2\text{R}'$	Холин Ацетилхолин	$\text{R} = \text{CH}_3, \text{R}' = \text{CH}_2\text{OH}$ $\text{R} = \text{CH}_3, \text{R}' = \text{CH}_2\text{OCOCH}_3$
Гетероциклические азотистые соединения		
$\text{RCH}_2-\overset{+}{\text{N}} \begin{array}{c} \diagup \text{CH}_3 \\ \diagdown \text{CH}=\text{S}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH} \end{array}$	Тиамин	NH_2 
	N-Метилникотинамид НАД НАДФ	Адениндиуклеотид Адениндиуклеотидфосфат

фаты, в том числе аденозинтрифосфат (АТФ) и аденозиндифосфат (АДФ), а также пирофосфаты других нуклеозидов (см. табл. 21).

Наиболее важной среди них выступает система АТФ—АДФ. В ходе катаболических реакций, сопровождающихся выделением энергии, АДФ может присоединять фосфатную группу и образовывать АТФ, а в ходе сопряженных реакций, протекающих с потреблением энергии, АТФ отщепляет фосфатную группу и дает АДФ, т. е. система АТФ—АДФ действует как переносчик химической энергии в клетке. Очень небольшие количества АТФ и АДФ присутствуют в клетке в виде свободных анионов, а в основном эти соединения представлены в виде комплексов с магнием, содержащихся в клетке в эквимольных соотношениях [3]. Причиной, определяющей роль АТФ как источника энергии, является наличие пирофосфатной связи, энергия которой благодаря высокой концентрации отрицательных зарядов значительно превышает энергию любой другой химической связи.

Большая величина свободной энергии гидролиза АТФ до АДФ определяется следующими причинами [4, 7, 18, 19].

1. Близким расположением отрицательных зарядов кислородных атомов, создающих в молекуле напряжение, которое снижается в результате гидролиза. Силы электростатического отталкивания также вносят свой вклад в энергию, высвобождающуюся при гидролизе.

2. При отщеплении ортофосфат-иона от молекулы АТФ увеличивается число возможных резонансных форм, т. е. продукты реакции гидролиза более стабильны, чем АТФ. Всякое увеличение резонанса в резонансной системе сопровождается выделением энергии, которая была затрачена при образовании «макроэргической» связи при синтезе молекулы АТФ. Источником энергии, запасенной в АТФ и выделяемой при ее гидролизе, является внутренняя энергия молекул АДФ и фосфорной кислоты, участвующих в образовании ангидрида (макроэргической связи). Условно считают, что эта энергия локализована в кислородном мостике.

При дальнейшем гидролитическом расщеплении АМФ до аденозина и неорганического фосфата изменение свободной энергии хотя и имеет отрицательное значение, но величина его не превышает $-12,5$ кДж/моль, что соответствует значению ΔG^0 большого числа простых органических фосфорных эфиров.

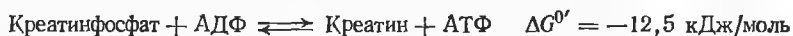
Следовательно, перенос химической энергии от высокоэнергетических фосфатов к низкоэнергетическим осуществляется путем переноса фосфатных групп при участии посредника АТФ—АДФ-системы. В клетке не происходит прямого переноса фосфатных групп, неизвестны ферменты, которые бы могли катализировать эти реакции. Практически все реакции переноса фосфатных групп в клетке (синтез белков, липидов, полисахаридов, РНК и ДНК) протекают с участием системы АТФ—АДФ [3].

Возможны реакции, в которых АТФ выступает пирофосфорилирующим агентом. При этом образуется аденозинмонофосфат, а пирофосфатная группировка переносится к акцептору. В этой роли АТФ участвует очень редко. В качестве примера можно привести образование фосфорибозилпирофосфата при взаимодействии АТФ с рибозо-5-фосфатом в биосинтезе нуклеиновых кислот, ферментативное активирование жирных кислот до КоА-производных в биосинтезе ацилглицеринов и фосфоглицеридов [3, 15].

Кроме системы АТФ—АДФ, необходимого участника всех главных энергетических превращений клетки, в процессах, связанных с переносом фосфатных групп, участвуют также ди- и трифосфаты других рибо- и

2-дезоксирибонуклеозидов. Так, УТФ (уридинтрифосфат) служит непосредственным донором фосфата, а следовательно, и энергии в синтезе полисахаридов в тканях животных (см. стр. 66). ЦТФ (цитидинтрифосфат) выполняет роль донора энергии на определенных этапах биосинтеза липидов (см. стр. 357). Но все эти нуклеотиды связаны с АТФ через фермент нуклеозиддифосфаткиназу, катализирующий обратимые реакции между нуклеотидами.

К высокоэнергетическим фосфорилирующим соединениям относят и амидинфосфаты (фосфогены). Важные представители фосфогенов — креатинфосфат (у большинства позвоночных) и аргининфосфат (у многих беспозвоночных) — являются производными гуанидина. В их молекулах атомы фосфора непосредственно связаны с азотом. Большое значение стандартной свободной энергии их гидролиза обусловлено трудностями стабилизации гуанидиновой и фосфатной групп в молекулах. В результате гидролиза отщепляется фосфатная группа, а продукты реакции стабилизируются. Фосфогены выполняют роль аккумуляторов энергии и возникают при фосфорилировании креатина и аргинина с помощью АТФ. В случае необходимости они могут освобождать энергию и ресинтезировать АТФ из АДФ. Эта обратимая реакция (реакция Ломана) катализируется фосфокиназами [12, 15, 20, 21]:

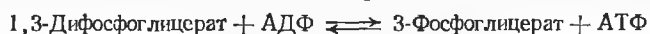


Значение этой реакции для энергетических процессов клетки велико.

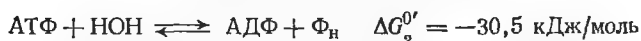
Накопление больших количеств АТФ при медленном его использовании приводит к фосфорилированию креатина. Во время интенсивного функционирования в условиях недостатка энергии фосфогены фосфорилируют АДФ до АТФ. Таким образом клетка поддерживает на соответствующем уровне необходимое количество энергии в виде молекул АТФ не только за счет внешних источников энергии, но и с помощью особых внутриклеточных систем, выполняющих функции дополнительных аккумуляторов энергии. Наиболее универсальным фосфогеном является система креатинфосфат — креатин. Особенно богаты креатинфосфатом клетки скелетных мышц, потребление энергии которыми колеблется в широких пределах.

У некоторых видов бактерий и грибов роль фосфогена выполняют неорганические полифосфаты [9, 17].

Ацилфосфаты и енолфосфаты составляют второй класс высокоэнергетических фосфатов. Ацилфосфаты представлены 1,3-дифосфоглицериновой кислотой и ацетилфосфатом. 1,3-Дифосфоглицериновая кислота образуется при гликолизе (см. стр. 68); она не подвергается гидролизу, а ее фосфатная группа переносится на АДФ с образованием АТФ и 3-фосфоглицериновой кислоты. Для расчета стандартной свободной энергии этой реакции ее необходимо представить в виде двух последовательных реакций, значения $\Delta G^{0'}$ которых можно вычислить:



$$\Delta G_1^{0'} = -18,8 \text{ кДж/моль}$$



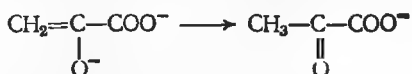
Используя принцип аддитивности, получаем значение изменения стандартной свободной энергии гидролиза 1-фосфатной группы 1,3-дифосфоглицерата:

$$\Delta G^{0'} = -30,5 + (-18,8) = -49,3 \text{ кДж/моль}$$

Большое отрицательное значение этой величины для ацилфосфата — смешанного ангидрида фосфорной и карбоновой кислот — объясняется сильно выраженным эффектом стабилизации продуктов гидролиза за счет делокализации электронов.

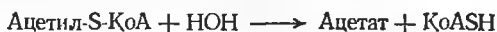
Ацетилфосфат, будучи активной формой ацетата, используется клеткой и в ряде метаболических процессов как предшественник ацетил-КоА.

2-Фосфоенолпировиноградная кислота образуется при гликолизе (см. стр. 68) и передает свою фосфатную группу молекуле АДФ. Эта реакция также характеризуется большим отрицательным значением ΔG° , равным $-62,0$ кДж/моль, так как это соединение является ангидридом двух кислот (фосфорной и енолпировиноградной). В процессе гидролиза первоначально образовавшаяся ионизованная енольная форма пировиноградной кислоты переходит в более устойчивую при pH 7 кетоформу

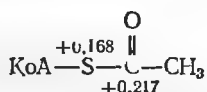


что способствует смещению общего равновесия реакции гидролиза в сторону завершения.

К высокоэнергетическим соединениям относят и другие вещества, запасующие энергию в форме химической связи не фосфатных, а других функциональных групп, например тиоэфиры. Важным представителем этой группы является ацетил-КоА («активный ацетат»). Стандартная свободная энергия гидролиза тиоэфиров



составляет около $-31,5$ кДж/моль. «Макроэргичность» этих соединений в значительной степени связана с тем, что связь C—S, подвергающаяся гидролизу, образована двумя положительно заряженными атомами [15]:



Более высокую энергию гидролиза тиоэфиров по сравнению с кислородсодержащими эфирами объясняют также уменьшением взаимодействия между электронами атома серы и карбонильного кислорода в тиоэфирах.

К классу богатых энергией соединений принадлежат и ониевые соединения (см. табл. 21). К ним относятся сульфониевые, четвертичные аммониевые и гетероциклические ониевые соединения. Из сульфониевых соединений известен, например, S-аденозилметионин (активный метионин), который выполняет роль донора метильной группы в процессах биологического метилирования, протекающих с участием метильной группы метионина.

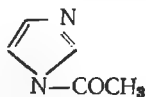
Среди алифатических четвертичных аммониевых соединений следует отметить холин — важный компонент фосфолипидов, а также его эфиры, например ацетилхолин, участвующий в процессах нервной деятельности.

К гетероциклическим ониевым соединениям относятся производные тиазолия, например тиамин, являющийся важным коферментом, а также соединения пиридина. Среди них следует отметить пиридиндинуклеотиды (НАД, НАДФ), выполняющие роль коферментов в окислительно-восстановительных процессах. Восстановленные пиридиндинуклеотиды (НАД-Н+Н⁺, НАДФ-Н+Н⁺) аналогично АТФ являются общими для

всех клеток первичными переносчиками химической энергии. НАДФ-Н+ + Н⁺ возникает в пентозном цикле (см. стр. 70). Так как НАД-Н+ + Н⁺ и НАДФ-Н+ + Н⁺ находятся в равновесии друг с другом (в клетках имеются ферменты, катализирующие перенос водорода от восстановленной формы одного нуклеотида на окисленную форму другого), то образование НАДФ-Н+ + Н⁺ эквивалентно образованию НАД-Н+ + Н⁺ [3, 7].

Общим свойством для всех ониевых соединений, дающим основание отнести их к веществам, богатым энергией, является наличие суммарного положительного заряда на обоих концах разрывающейся связи.

Сравнительно недавно к соединениям, богатым энергией, стали относить и ацетилимидазол



значение свободной энергии гидролиза которого составляет около —54,5 кДж/моль. Ацетилимидазол и другие ацилимидазолы служат переносчиками богатых энергией связей в ферментативных реакциях [15].

ЭНЕРГЕТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ ЖИВОЙ КЛЕТКИ

Под энергетическими механизмами клетки следует понимать процессы клеточного обмена, с помощью которых энергия внешних энергетических ресурсов превращается в химическую энергию фосфатных связей АТФ [3, 7, 21].

Наиболее примитивным способом извлечения энергии из внешних энергетических ресурсов, в частности из глюкозы, является брожение. Брожение — это окислительно-восстановительный процесс, в котором суммарная степень окисления продуктов реакций не отличается от степени окисления исходных веществ. Роль окислителя (аккумулятора электронов) играет какая-либо органическая молекула, образующаяся в ходе брожения. Существуют два типа брожения — гликолиз и спиртовое брожение. Процесс гликолиза выражается суммарным уравнением:



молочная кислота

а спиртовое брожение уравнением:



этанол

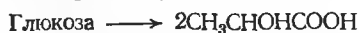
Для обоих процессов характерны одни и те же механизмы превращения энергии; различие имеется только на заключительных стадиях. В уравнениях этих процессов кислород отсутствует, однако оба они включают окислительно-восстановительные реакции.

Рассматривая конечные продукты спиртового брожения, видно, что этанол можно представить как относительно восстановленное соединение (молекула содержит водород), а СО₂ — как относительно окисленное вещество (водород отсутствует). Окислительно-восстановительный процесс в гликолизе проявляется в еще менее отчетливой форме. Тем не менее в молекуле молочной кислоты один конец (метильная группа) находится в более восстановленной форме, чем другой конец (карбоксильная группа). Вместе с тем в исходной молекуле глюкозы атомы водорода распределены более равномерно.

Учитывая тот факт, что реакции, обеспечивающие выделение энергии, сохраняемой в форме АТФ, при гликолизе и спиртовом брожении идентичны, рассмотрим лишь гликолиз, свойственный более высокоорганизованным клеткам.

Субстратное фосфорилирование при гликолизе

Чтобы исследовать энергетические возможности гликолиза, его необходимо расчленить на два процесса: превращение глюкозы в молочную кислоту (экзергонический процесс)

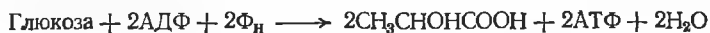


$$\Delta G_1^{0'} = -196,9 \text{ кДж/моль } (-47,0 \text{ ккал/моль})$$

и образование АТФ из АДФ и неорганического фосфата (эндергонический процесс):



Суммарная реакция:



$$\Delta G^{0'} = \Delta G_1^{0'} + \Delta G_2^{0'} = -196,9 + 61,0 =$$

$$= -135,9 \text{ кДж/моль } (-32,4 \text{ ккал/моль})$$

Необходимо отметить, что расчеты относятся к 1,0 М концентрациям веществ. В этом процессе количество выделяющейся энергии значительно больше, чем необходимо для фосфорилирования АДФ до АТФ.

Гликолиз представляет собой необратимый процесс, равновесие которого полностью смещено в сторону образования молочной кислоты, что можно объяснить значительным уменьшением свободной энергии ($\Delta G^{0'} = -135,9$ кДж/моль). В то же время большая часть этапов этого процесса имеет небольшие значения изменений свободной энергии.

Первая стадия гликолиза (см. стр. 70) начинается с фосфорилирования моносахаридов и образования глюкозо-6-фосфата [1, 3, 7, 9, 12, 15, 16, 22, 23]. Реакции фосфорилирования сопровождаются уменьшением свободной энергии [$\Delta G^{0'} = -16,7$ кДж/моль ($-4,0$ ккал/моль)], что указывает на их необратимость. В клетках печени идет процесс дефосфорилирования глюкозо-6-фосфата [$\Delta G^{0'} = -13,8$ кДж/моль ($-3,3$ ккал/моль)], который очень важен для организма, так как при этом регенерируется глюкоза и обеспечивается поступление ее в кровь. Однако он катализируется другой ферментной системой. Изомеризация глюкозо-6-фосфата во фруктозо-6-фосфат [$\Delta G^{0'} = +1,67$ кДж/моль ($+0,4$ ккал/моль)] является обратимой реакцией.

Важным этапом серии гликолитических реакций является превращение фруктозо-6-фосфата во фруктозо-1,6-дифосфат. В этой реакции, определяющей скорость всего процесса гликолиза (см. стр. 70), используется еще одна молекула АТФ (роль донора фосфата могут выполнять также УТФ и ИТФ) [3]. Эта реакция в клетке практически необратима [$\Delta G^{0'} = -14,2$ кДж/моль ($-3,4$ ккал/моль)]. Обратное превращение фруктозо-1,6-дифосфата во фруктозо-6-фосфат идет в клетке, но оно протекает по другой реакции (гидролиз под действием фермента фосфатазы, $\Delta G^{0'} = -16,7$ кДж/моль).

Образованием альдотриозофосфата при расщеплении фруктозо-1,6-дифосфата ($\Delta G^{0'} = +24,0$ кДж/моль)



заканчивается первая (пусковая) стадия гликолиза. Большое положительное значение изменения стандартной свободной энергии этой реакции делает протекание ее в прямом направлении мало возможным, тем

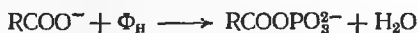
не менее в клетке эта реакция имеет место, так как концентрация фруктозо-1,6-дифосфата в ней намного ниже, чем стандартная концентрация (1,0 М), применяемая в расчетах ΔG^0 . Как известно, в реакциях, где молекула исходного вещества расщепляется с образованием двух других молекул, на положение равновесия сильно влияет концентрация исходного вещества. Так, чем ниже концентрация фруктозо-1,6-дифосфата, тем большая доля его должна расщепиться, чтобы состояние достигло равновесия [3]. Из двух триозофосфатов в дальнейших реакциях используется только альдотриозофосфат, а кетотриозофосфат превращается в него по обратимой реакции [$\Delta G^0 = +7,65$ кДж/моль (+1,38 ккал/моль)] [7, 9].

Вторая стадия гликолиза объединяет окислительно-восстановительные реакции и сопряженные с ними реакции фосфорилирования, обеспечивающие синтез АТФ. Первая реакция этой стадии состоит в освобождении энергии при окислении альдегидной группы альдотриозофосфата до 3-фосфоглицериновой кислоты. Выделяющаяся энергия расходуется на образование высокоэнергетического продукта окисления — 1,3-дифосфоглицериновой кислоты, представляющей собой смешанный ангидрид фосфорной (неорганический фосфат) и 3-фосфоглицериновой кислот и имеющей еще более отрицательное значение стандартной свободной энергии гидролиза, чем АТФ. Окислителем в этой реакции выступает НАД⁺, который, присоединяя электроны, отданные альдотриозофосфатом, превращается в восстановленную форму. Суммарная реакция имеет небольшое положительное значение ΔG^0 , равное +6,27 кДж/моль (+1,5 ккал/моль), и поэтому является обратимой. Чтобы проанализировать энергетические изменения, происходящие при образовании 1,3-дифосфоглицерата, представим эту реакцию в виде двух процессов: окисление альдотриозофосфата (RCHO) до 3-фосфоглицерата (RCOO⁻)



$$\Delta G^0 = -43,0 \text{ кДж/моль } (-10,3 \text{ ккал/моль})$$

и фосфорилирование 3-фосфоглицерата (RCOO⁻) до 1,3-дифосфоглицерата (RCOOP₃⁻):



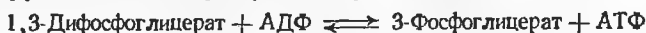
$$\Delta G_2^0 = +49,3 \text{ кДж/моль } (+11,8 \text{ ккал/моль})$$

Суммарная реакция:



$$\Delta G^0 = \Delta G_1^0 + \Delta G_2^0 = -43,0 + 49,3 = +6,3 \text{ кДж/моль } (+1,5 \text{ ккал/моль})$$

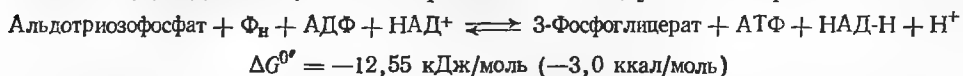
Окисление — процесс экзергонический и в обычных условиях протекает в сторону завершения. Фосфорилирование — эндергоническая реакция — и в таких условиях практически идти не может. В суммарной же ферментативной реакции эндергонический процесс сопряжен с экзергоническим, и энергия, выделяемая при окислении, запасается в 1,3-дифосфоглицератом в форме химической энергии. Далее происходит перенос фосфатной группы с 1,3-дифосфоглицерата на АДФ:



$$\Delta G^0 = -18,85 \text{ кДж/моль } (-4,5 \text{ ккал/моль})$$

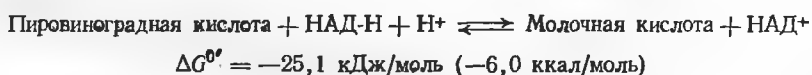
Эта экзергоническая реакция и дает возможность предыдущей реакции идти в сторону завершения.

Суммарное уравнение двух реакций, обеспечивающих окисление альдотриозофосфата до 3-фосфоглицерата с одновременным фосфорилированием АДФ до АТФ, можно представить следующим образом:



т. е. энергия окисления выше, чем необходимо для фосфорилирования АДФ.

Далее происходит перенос фосфатной группы внутри молекулы 3-фосфоглицерата с образованием 2-фосфоглицерата ($\Delta G^{0'} = +4,44 \text{ кДж/моль}$), протекающий обратимо, а затем — реакция, в процессе которой образуется высокоэнергетическая связь, — превращение 2-фосфоглицерата в фосфоенолпировиноградную кислоту. Эту реакцию можно рассматривать как внутримолекулярный окислительно-восстановительный процесс, так как после отщепления воды от молекулы 2-фосфоглицерата степень окисления второго углеродного атома увеличивается, а третьего уменьшается. Значение $\Delta G^{0'}$ [$+1,84 \text{ кДж/моль}$ ($+0,44 \text{ ккал/моль}$)] невелико, однако отщепление фосфатной группы от исходного и конечного соединений этой реакции сопровождается изменениями стандартной свободной энергии, равными соответственно $-17,6 \text{ кДж/моль}$ ($-4,2 \text{ ккал/моль}$) и $-62,0 \text{ кДж/моль}$ ($-14,8 \text{ ккал/моль}$), что, по-видимому, можно объяснить внутримолекулярным перераспределением энергии. Перенос фосфатной группы с фосфоенолпировиноградной кислоты на АДФ с образованием АТФ — сильно экзергоническая реакция, практически необратимая, $\Delta G^{0'} = -37,0 \text{ кДж/моль}$ ($-7,5 \text{ ккал/моль}$). Заканчивается гликолиз восстановлением пировиноградной кислоты до молочной кислоты за счет присоединения электронов, которые были отданы альдотриозофосфатом при его окислении:



Эта реакция сильно смещена вправо и завершает окислительно-восстановительный цикл гликолиза.

Уравнение полного баланса гликолиза:



Таким образом в результате гликолиза из одной молекулы глюкозы возникают две молекулы молочной кислоты, а две молекулы АДФ превращаются в две молекулы АТФ. Кроме того, происходит перенос четырех электронов от альдотриозофосфата к пировиноградной кислоте в форме $2\text{НАД-Н} + 2\text{H}^+$. Необходимо отметить, что моносахариды гликогена и крахмала также вовлекаются в процесс гликолиза по описанному механизму [3].

Окислительное фосфорилирование при дыхании

Дыхание — это также процесс окисления, при котором электроны переносятся от органических молекул, выполняющих роль «топлива», на молекулярный кислород. Сравнение значений изменения стандартной свободной энергии при анаэробном превращении глюкозы в молочную кислоту ($\Delta G^{0'} = -196,9 \text{ кДж/моль}$) и при полном окислении ее до CO_2 и H_2O в аэробных условиях (процесс дыхания) ($\Delta G^{0'} = -2890 \text{ кДж/моль}$)

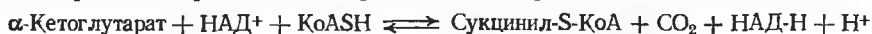
ясно показывает намного больший выход энергии при дыхании, чем при гликолизе. Этот факт можно объяснить тем, что молочная кислота (продукт гликолиза) представляет собой еще достаточно сложное соединение и имеет практически почти ту же степень окисления, что и глюкоза. в то время как продукт дыхания — двуокись углерода — соединение простое, имеющее только один, полностью окисленный атом углерода. Кроме того, количество энергии, получаемое при переносе электронов к акцептору, сильно зависит от его природы. Если акцептором служит кислород, как при дыхании, то количество освобождающейся энергии намного превосходит энергию, получаемую при гликолизе, где акцептором служит пировиноградная кислота [3].

Процесс дыхания включает три стадии [3, 7, 9]: 1) окислительное образование ацетил-КоА из пировиноградной кислоты, жирных кислот и аминокислот на второй стадии катаболизма углеводов, липидов, белков (см. стр. 392), 2) распад ацетильных групп в цикле трикарбоновых кислот с образованием CO_2 и атомов водорода (см. стр. 399), 3) перенос электронов (соответствующих этим атомам водорода) по дыхательной цепи к конечному акцептору электронов — молекулярному кислороду, сопровождающийся большим уменьшением свободной энергии, значительная часть которой запасается в форме АТФ за счет сопряженного с окислением фосфорилирования АДФ.

Главная функция цикла Кребса для энергетики клетки состоит в высвобождении четырех пар атомов водорода и соответствующих им электронов. Атомы водорода выделяются в результате следующих четырех реакций окисления.

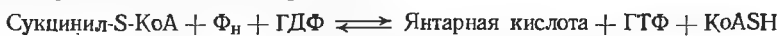
1) Окисление изолимонной кислоты до α -кетоглутаровой, где в качестве акцептора электронов выступает НАД⁺. Эта реакция сопровождается значительным уменьшением свободной энергии.

2) Окисление α -кетоглутаровой кислоты в янтарную, протекающее в две стадии. На первой из них α -кетоглутарат претерпевает окислительное декарбоксилирование с образованием сукцинил-S-КоА и CO_2 :



$$\Delta G^0 = -33,5 \text{ кДж/моль } (-8,0 \text{ ккал/моль})$$

На следующей стадии высокоэнергетическое соединение сукцинил-S-КоА теряет свою КоА-группу, а освобожденная энергия идет на фосфорилирование ГДФ по реакции:



$$\Delta G^0 = -2,93 \text{ кДж/моль } (-0,7 \text{ ккал/моль})$$

Образовавшийся ГТФ отдает свою концевую фосфатную группу АДФ с образованием АТФ. Синтез АТФ, сопряженный с деацилированием сукцинил-S-КоА, называют фосфорилированием на уровне субстрата. Последняя реакция окисления в цикле Кребса превращает яблочную кислоту в щавелевоуксусную:



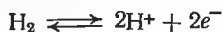
$$\Delta G^0 = +29,7 \text{ кДж/моль } (+7,1 \text{ ккал/моль})$$

Реакция имеет эндергонический эффект, но в клетке идет в прямом направлении, так как ее продукты (щавелевоуксусная кислота и НАД-Н) быстро уходят из сферы реакции. Щавелевоуксусная кислота, связываясь с ацетил-КоА, дает начало новому циклу.

Итак, в результате одного цикла Кребса образовалось четыре пары атомов водорода; три пары атомов водорода восстановили НАД⁺, а четвертая — ФАД сукцинатдегидрогеназы, но в конечном итоге все атомы водорода превращаются в ионы Н⁺, а соответствующее им число электронов переносится по дыхательной цепи к кислороду, отдавая по пути свою энергию на фосфорилирование АДФ (см. стр. 404).

Чтобы проанализировать энергетические возможности окислительно-го фосфорилирования, рассмотрим окислительно-восстановительные реакции дыхательной цепи, каждая из которых содержит окислительно-восстановительную пару — донор и акцептор электронов — и может быть охарактеризована стандартным восстановительным потенциалом, показывающим способность восстановителя отдавать электрон окислителю [8].

Стандартный восстановительный потенциал можно определить как меру электронного давления, возникающего в определенных условиях в восстановительно-окислительной паре в состоянии равновесия. За стандарт принят восстановительный потенциал пары Н₂—2Н⁺ в реакции



который при давлении газообразного Н₂ 1,0 кгс/см², концентрациях ионов Н⁺ 1,0 М (что соответствует рН 0) и температуре 25 °С условно считают равным нулю. В пересчете для рН 7,0 ([Н⁺]=1·10⁻⁷ М), т. е. для значения рН, выбранного за стандарт в биохимических расчетах, стандартный восстановительный потенциал системы Н₂—2Н⁺ равен —0,42 В. Системы с более отрицательным значением стандартного восстановительного потенциала, чем у пары Н₂—2Н⁺, обладают большей, чем у водорода, способностью отдавать электроны. Таким образом, стандартные восстановительные потенциалы биологических систем позволяют предвидеть направление потока электронов от одной окислительно-восстановительной пары к другой при стандартных условиях, а также рассчитать изменения свободной энергии, сопровождающие перенос электронов. В результате окислительно-восстановительных реакций происходит выделение энергии, а стандартное изменение свободной энергии, сопровождающее каждую химическую реакцию (ΔG^0), выражается уравнением (см. стр. 411):

$$\Delta G^0 = -RT \ln K_p$$

Когда реагируют две окислительно-восстановительные пары с известными стандартными восстановительными потенциалами, это уравнение можно представить в другом виде

$$\Delta G^0 = -nF\Delta E'_0$$

где n — число перенесенных электронов, F — число Фарадея (96,4 кДж/моль) и $\Delta E'_0$ — разность стандартных восстановительных потенциалов акцептора и донора электронов (при 1,0 М концентрации реагирующих компонентов, 25 °С, рН 7,0). Для случая, когда пара электронных эквивалентов переносится от НАД-Н ($E'_0 = -0,32$ В) к молекулярному кислороду ($E' = +0,82$ В), пользуясь приведенным уравнением, рассчитывают изменение стандартной свободной энергии:

$$\Delta G^0 = -2 \cdot 96,4 [0,82 - (-0,32)] = -221,0 \text{ кДж/моль } (-52,7 \text{ ккал/моль})$$

Следовательно, перенос электронов через всю дыхательную цепь сопровождается значительным уменьшением свободной энергии, за счет

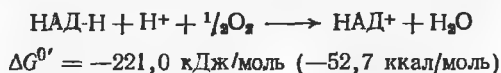
которой при наличии сопряжения в дыхательной цепи может быть синтезировано несколько молекул АТФ из АДФ и фосфата.

С помощью таких же расчетов, предполагающих наличие термодинамического равновесия на каждой стадии и присутствия всех компонентов в стандартных концентрациях (1,0 М), можно найти значения $\Delta G^{0'}$ для каждой стадии переноса электронов в дыхательной цепи. Три участка этой цепи, а именно участки между НАД и КоQ, цитохромами *b* и *c* и между цитохромами *a* и кислородом, имеют достаточно большое уменьшение свободной энергии, равное соответственно $\Delta G_1^{0'} = -51$ кДж/моль, $\Delta G_2^{0'} = -41,4$ кДж/моль, $\Delta G_3^{0'} = -99,6$ кДж/моль, которое может обеспечить сопряженное фосфорилирование АДФ до АТФ.

Суммарный процесс фосфорилирования, сопряженного с окислением, можно выразить так:



Для анализа этого процесса с точки зрения энергетических возможностей целесообразно разделить его на две стадии: экзергоническую



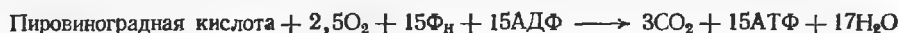
и эндергоническую:



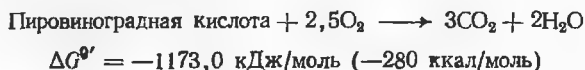
Эти данные ясно показывают, что при сопряженном фосфорилировании запасается около 40% $[(91,7/221,0) \cdot 100]$ всей освобождающейся в процессе переноса электронов энергии.

Общий баланс энергии дыхательной цепи можно подсчитать следующим образом [3, 7].

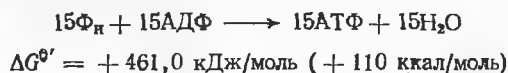
Два из десяти электронов, входящих в цепь переноса через янтарную кислоту, обеспечивают синтез двух молекул АТФ. Остальные восемь электронов, доставляемые в цепь с помощью НАД-Н, участвуют в синтезе двенадцати молекул АТФ. Кроме этого, одна молекула АТФ синтезируется не в цепи переноса электронов, а в наружной митохондриальной мембране по механизму фосфорилирования на уровне субстрата. В итоге цикл трикарбоновых кислот дает пятнадцать молекул АТФ. Суммарное уравнение окисления пировиноградной кислоты (цикл трикарбоновых кислот) можно представить следующим образом:



Экзергонический компонент:



Эндергонический компонент:



т. е. в форме АТФ запасается около 39% $[(461,0/1173,0) \cdot 100]$ свободной энергии окисления пировиноградной кислоты.

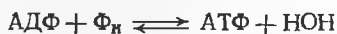
Среди большого числа неясных вопросов [3, 8, 14], касающихся процесса дыхания, особенно много споров вызывал механизм окислительного фосфорилирования. Первоначально для объяснения феномена сопряжения (см. стр. 409) была выдвинута так называемая химическая гипотеза.

Эта гипотеза согласуется с рядом экспериментальных данных, но исходя из нее трудно объяснить, каким образом мембраны митохондрий участвуют в фосфорилировании (нарушение их структуры разобщает сопряжение) [8, 15, 33]; кроме того, не удалось выделить постулируемых высокоэнергетических соединений [3, 7].

Предположения некоторых исследователей [3, 7] о том, что энергия, освобождающаяся в процессе переноса электронов, используется первоначально для перевода внутренней мембраны митохондрий в новое, богатое энергией состояние (конформационные изменения) и что такое состояние мембраны является движущей силой окислительного фосфорилирования АДФ до АТФ, вызвали к жизни гипотезу так называемого механохимического или конформационного сопряжения (см. стр. 409).

В настоящее время наиболее экспериментально обоснованной считают хемиосмотическую гипотезу, предложенную П. Митчеллом. Предполагают, что в процессе переноса электронов по дыхательной цепи, сосредоточенной в митохондриальной мембране, возникает градиент концентрации ионов H^+ (или $\Delta\mu_{H^+}$ — разность электрохимических потенциалов ионов водорода) в направлении, перпендикулярном митохондриальной мембране. Этот градиент возникает в результате удаления ионов H^+ из внутримитохондриального пространства в окружающую среду и поддерживается за счет уменьшения свободной энергии, сопровождающего перенос электронов. Предполагают, что ионы H^+ , образующиеся при переносе электронов, удаляются в цитоплазму, а потребляемые ионы H^+ (для связывания гидроксидов) могут извлекаться только из внутреннего пространства митохондрий. Следовательно, градиент ионов H^+ есть богатое энергией состояние, сохраняющее энергию переноса электронов, и представляет собой движущую силу процесса фосфорилирования [3, 8, 14].

Фосфорилирование можно представить как реакцию дегидратации

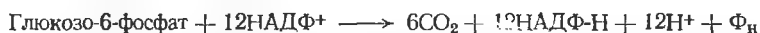


стандартная свободная энергия которой равна $+30,5$ кДж/моль ($+7,3$ ккал/моль). Согласно данной гипотезе, фермент, катализирующий эту реакцию (АТФ-аза), отщепляет воду в виде ионов H^+ и HO^- , затем ион H^+ попадает во внутреннее пространство митохондрии, где связывается с избыточным количеством имеющихся там ионов HO^- с образованием воды, а ионы HO^- , выходящие в наружное пространство, связываются с избыточным количеством ионов H^+ во внешней среде, также давая воду. Таким образом, ионы H^+ , «выбрасываемые» наружу за счет энергии переноса электронов, создают трансмембранный потенциал, энергия которого расходуется на фосфорилирование, повышенная же снаружи концентрация ионов H^+ способствует смещению реакции фосфорилирования вправо [3, 8, 14]. При этом система находится в стационарном состоянии (см. стр. 407), при котором скорость возникновения градиента уравнивается скоростью его разрушения при образовании АТФ. В настоящее время считают, что данная гипотеза может быть принята как теория, объясняющая принцип окислительного фосфорилирования.

Многочисленными экспериментами показано также, что генерировать мембранный потенциал может не только цепь переноса электронов, но и АТФ-аза — фермент, катализирующий гидролиз АТФ. Следовательно, мембранный потенциал, являясь общим продуктом двух источников энергии — энергии переноса электронов и энергии фосфатных связей АТФ, может рассматриваться как универсальный продукт систем энергетического сопряжения [14].

Пентозофосфатный путь

В живых системах имеет место последовательность реакций, осуществляющих окисление глюкозы до CO_2 и H_2O , минуя процесс гликолиза и цикл Кребса. Этот широко распространенный в природе процесс катализируется определенными ферментами и известен также как фосфоглюконатный, или гексозомонофосфатный путь, или пентозный цикл, так как является поставщиком пентоз в биосинтезе нуклеиновых кислот (см. кн. I, стр. 435) [3, 4, 7, 22—24]. С точки зрения биоэнергетических превращений он интересен тем, что осуществляет регенерацию в цитоплазму клеток восстановительных эквивалентов в форме НАДФ-Н + H^+ , носителями энергии в которых являются электроны (см. стр. 70). Энергия в пентозном цикле освобождается в результате двух реакций: превращения глюкозо-6-фосфата в 6-фосфоглюконат и последующего окислительного декарбоксилирования 6-фосфоглюконата в рибулозо-5-фосфат. Суммарное уравнение этого процесса можно представить следующим образом:



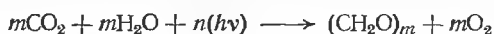
В конечном итоге весь глюкозо-6-фосфат может окисляться до CO_2 и H_2O . Однако теоретические возможности пентозного цикла редко реализуются живой клеткой. Гораздо чаще, видимо, фосфоглюконатный путь на определенных этапах переходит в гликолитический.

Пентозофосфатный путь не является главным при окислении глюкозы, но он очень важен для клеток, в которых идет интенсивный восстановительный процесс, например синтез жирных кислот и стероидов из предшественников (клетки молочной железы, печени, жировой ткани коры надпочечников и др.).

Фотофосфорилирование

Фотосинтетическое фосфорилирование в процессе фотосинтеза представляет собой один из путей накопления энергии в клетках зеленых растений, обладающих фототрофным типом энергетического обмена. Будучи первичным механизмом накопления энергии в живых системах, фотосинтез имеет более короткий путь от внешнего энергетического ресурса, которым является солнечный свет, до АТФ, чем другие типы биоэнергетики. Кроме того, реакции фототрофного типа накопления энергии четко обособлены от других обменных процессов в отличие от органотрофного типа, реакции которого в значительной степени пересекаются с путями промежуточного обмена веществ [3, 7, 12, 16, 23, 25, 26]. Фотосинтез протекает в тилакоидах — пузырьках, расположенных внутри хлоропластов и уложенных в виде гран. Почти у всех фотосинтезирующих организмов в роли донора электронов выступает вода, кислород которой выделяется

в окружающую среду. Суммарное уравнение фотосинтеза для этой группы организмов (высшие растения) можно представить так



где m принимают равным 6, что соответствует образованию глюкозы $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$.

У фотосинтезирующих бактерий донорами электронов являются H_2S , H_2 или органические соединения [3]. Главным акцептором электронов у большинства фотосинтезирующих организмов служит CO_2 , но могут также использоваться азот, нитрат, ионы водорода [3].

Фотосинтезирующие клетки содержат три типа поглощающих свет пигментов (хлорофиллы, каротиноиды и фикобилины), которые функционируют в виде ансамблей или фотосистем. В клетках, выделяющих кислород, имеются две фотосистемы [3, 9]. Фотосистема I содержит хлорофилл a и β -каротин, а также пигмент, поглощающий свет при 700 нм и названный пигментом P_{700} . Это специализированная форма молекул хлорофилла, составляющая $1/400$ общего количества хлорофилла в клетке [8, 35, 45]. Фотосистема II содержит другой набор пигментов (хлорофиллы a , b , c или d и др.), активируется светом с меньшей длиной волны (P_{680}) и связана с реакциями, выделяющими кислород (организмы, не выделяющие кислород, например бактерии, не имеют фотосистемы II).

Энергия, поглощенная системой II, используется для синтеза АТФ. Система I расходует энергию солнечного света для обеспечения окислительно-восстановительных синтезов. При взаимодействии этих двух фотохимических систем при фотосинтезе протекают следующие процессы: синтез АТФ и синтез глюкозы из CO_2 и H_2O с выделением кислорода [7, 9, 12, 16, 25, 26] (рис. 29). Фотосистемы I и II объединены в агрегат. Предполагают, что полный набор пигментов и переносчиков электронов систем I и II и связанные с ними липиды объединены в структурно-функциональный комплекс, названный квантосомой [3]. Такого рода комплексы обнаружены в мембранах хлоропластов.

Возбуждение фотосистемы I повышает потенциал электрона, попадающего к акцептору Z, до значения, достаточного для восстановления НАДФ⁺. При этом электрон проходит через цепь переносчиков: ферредоксин и ферредоксин-НАДФ⁺-оксиредуктазу [3, 26, 27]. Место «выбитаго» электрона фотосистемы I под действием экситонов — квантов энергии возбуждения — заполняется электронами, поступающими от возбуждения фотосистемы II светом с более короткой длиной волны. При этом электрон реакционного фотоцентра переходит в состояние с повышенным потенциалом и попадает к акцептору Q. Затем электрон через центральную цепь переноса, в которую входят пластохинон, цитохром b_6 , цитохром f и пластоцианин, попадает в фотосистему I. Электроны, необходимые для заполнения фотосистемы II, поступают от молекулы воды (фотолиз), которая отдает водород в виде ионов H^+ в результате функционирования неизвестных механизмов. При этом атомы кислорода соединяются в молекулу O_2 .

Получив электрон от фотосистемы I и ион H^+ от фотолиза воды, НАДФ⁺ превращается в НАДФ-Н, вступающий затем как восстановитель в процесс ассимиляции CO_2 в синтезе глюкозы (см. стр. 64). Необходимо отметить, что синтез глюкозы из CO_2 и H_2O непосредственно не требует света для своего осуществления и представляет собой серию темновых реакций (темновая реакция фотосинтеза). Однако необходимые для этих реакций соединения — АТФ и НАДФ-Н — синтезируются

только в присутствии света. Суммарное уравнение, описывающее темновой процесс восстановления CO_2 , приведено ниже:



Вызванный действием света поток электронов от H_2O или другого донора через хлорофилл к НАДФ^+ или другому акцептору, восстановленная форма которого накапливается, называется нециклическим потоком. Существует также циклический поток электронов. Он также индуцирован световым квантом, но в его процессе накопление восстановленных веществ не наблюдается, а происходит только фосфорилирование АДФ до АТФ.

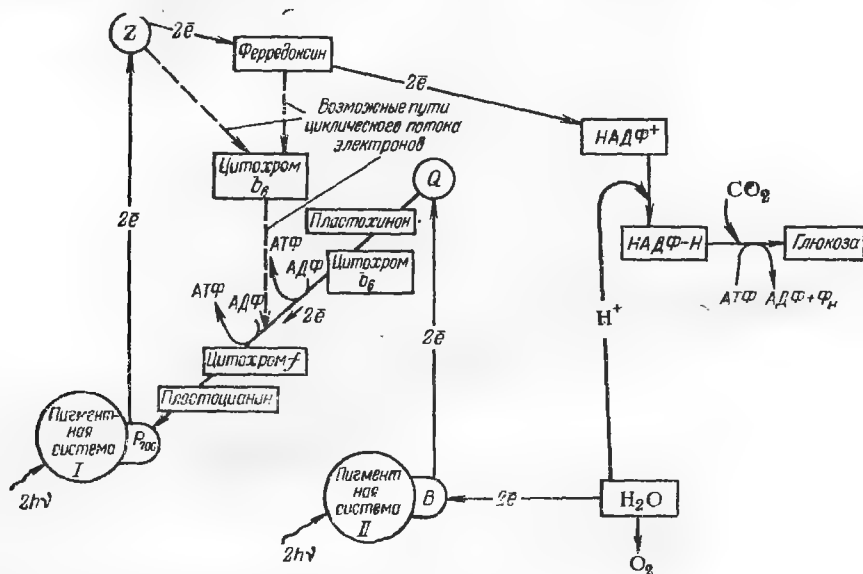


Рис. 29. Процесс фотосинтеза:

Z и Q — акцепторы фотосистем I и II соответственно; В — ловушка экситонов.

Таким образом, процесс фосфорилирования АДФ сопряжен с одной или несколькими цепями переноса электронов [3, 12, 25, 26]. Фотофосфорилирование, вероятно, имеет много общего с окислительным фосфорилированием. Был даже выделен фактор сопряжения фотофосфорилирования, обладающий АТФ-азной активностью, индуцируемой ионами Ca^{2+} [3]. Найдено также, что во время переноса электронов граны хлоропластов подвергаются характерным конформационным изменениям [3]. Для объяснения механизма фотофосфорилирования предлагаются три основные гипотезы (см. стр. 409) [3].

Ряд неясностей в процессе фотосинтеза вызвал среди биохимиков много споров относительно вопроса о максимальной термодинамической эффективности, или квантовой эффективности процесса фотосинтеза [8, 17]. Одна из главных проблем — определение числа световых квантов $n(h\nu)$, удовлетворяющих суммарному уравнению фотосинтеза (см. стр. 427). Изменение стандартной свободной энергии для реакции синтеза гексозы $\Delta G^\circ = +2870$ кДж/моль (+686 ккал/моль). На восстановление одной молекулы CO_2 до CH_2O необходимо $+2870/6 = +478$ кДж/моль (+114 ккал/моль).

Энергия световых квантов при 700 нм составляет примерно 176 кДж/моль (42 ккал/моль). Теоретически значение n для уравнения фотосинтеза при длине волны 700 нм должно быть не менее $478/176=2,7$. Из экспериментально найденных значений наиболее вероятно $n=8$.

Согласно уравнению на стр. 428, для восстановления одной молекулы CO_2 необходимы 3 молекулы АТФ и 2 молекулы НАДФ-Н. Для образования двух молекул НАДФ-Н (см. рис. 29) фотосистема I должна поднять на более высокий энергетический уровень четыре электрона, столько же электронов должна дать фотосистема II для получения одной молекулы O_2 . Так как для отщепления одного электрона необходим один световой квант, то для образования двух молекул НАДФ-Н и одной молекулы O_2 необходимы 8 квантов. Если считать, что на каждую пару электронов в течение всего процесса приходится одно фотофосфорилирование, то при переходе двух пар электронов от фотосистемы II к фотосистеме I должно образоваться две молекулы АТФ. Однако для восстановления CO_2 необходимы три молекулы АТФ. Если перенос пары электронов сопряжен с фотофосфорилированием в двух местах, как предполагают многие исследователи, то возникают четыре молекулы АТФ. Возможно, что при определенных условиях вступает в действие циклический поток электронов, который вырабатывает только АТФ. Эффективность фотосинтеза в природе намного ниже величин, вычисленных, исходя из молекулярных процессов. Например, сахарный тростник запасает в виде органических соединений до 8% поглощенной световой энергии. Кроме того, суммарная эффективность фотосинтеза понижается за счет процессов фотодыхания, протекающего в митохондриях фотосинтезирующих клеток. Фотодыхание рассматривают как короткозамкнутую цепь фотосинтеза, при котором восстановительная способность электронов расходуется не на восстановление CO_2 , а на восстановление молекулярного кислорода. Оно не сопровождается окислительным фосфорилированием АДФ.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЭНЕРГИИ БИОЛОГИЧЕСКИМИ СИСТЕМАМИ

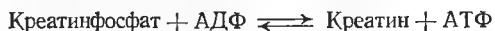
В отличие от способов получения пути использования энергии организмом значительно многообразнее. Энергия, аккумулированная в АТФ, а также в НАДФ-Н и других восстановительных коферментах, расходуется для совершения следующих внутриклеточных процессов: биосинтез, в процессе которого совершается химическая работа; сокращение и движение, представляющие собой разновидности механической работы; активный перенос, являющийся результатом осмотической работы [3, 7, 12, 23, 27]. Наиболее сложным и важным среди них является процесс биосинтеза компонентов клетки из их низкомолекулярных предшественников. Именно этот процесс участвует в создании и поддержании строго упорядоченной структуры живой клетки за счет ресурсов внешней среды.

Биохимия анаболизма углеводов, липидов, мононуклеотидов и других соединений рассмотрена в соответствующих разделах книги. Здесь будут отмечены лишь главные общие черты процессов анаболизма.

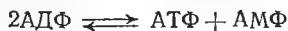
Анаболизм и катаболизм не являются просто обращенными процессами. Биосинтетические процессы имеют свои, независимые от катаболизма пути и всегда сопряжены с распадом АТФ, причем общее количество энергии, высвобождающееся из АТФ, значительно больше, чем необходимо для осуществления биосинтеза. Биосинтетическая реакция, сопряженная с распадом АТФ, всегда имеет отрицательное значение

стандартной свободной энергии, что способствует ее протеканию в сторону синтеза. Соответственно, все биосинтетические реакции имеют свой самостоятельный ферментативный контроль. Кроме того, процессы катаболизма и анаболизма локализованы в различных участках клетки. И вместе с тем, эти процессы взаимосвязаны: скорость расходования АТФ определяет скорость фосфорилирования АДФ за счет энергетических ресурсов внешней среды [3, 9, 12].

Проблемы, связанные с молекулярными основами превращений химической энергии АТФ в механическую энергию процессов сокращения и движения, чрезвычайно сложны [3, 15]. Это объясняется тем, что вне живого организма отсутствуют примеры непосредственного превращения химической энергии в механическую. Механическая работа может быть представлена сокращением мышц, а также движениями ресничек и жгутиков у простейших. Большинство клеток содержат сократительные нити (фибриллы), которые осуществляют организацию содержимого клетки, движение и перенос клеточных веществ, процессы клеточного деления и т. д. В качестве примера преобразования энергии АТФ в механическую работу можно привести процессы мышечного сокращения, связанные с использованием энергии АТФ [3, 15, 18], при этом важную функцию выполняют белковые компоненты мышечных клеток — комплекс миозина и актина, названный актомиозином. Актомиозин и его компонент миозин обладают АТФ-азной активностью, т. е. способны гидролизовать концевую фосфатную группу АТФ. Однако АТФ-азную активность актомиозина стимулируют ионы Mg^{2+} , а миозина — ионы Ca^{2+} . Сигналом для сокращения мышц является электрический импульс, приходящий из двигательного нерва через нервно-мышечное соединение. До получения импульса по обе стороны мембраны (сарколема) мышечной клетки поддерживается разность потенциалов (с наружной стороны имеется избыточный положительный заряд). При распространении импульса по мембране разность потенциалов сразу исчезает. Считают, что это является результатом резкого повышения проницаемости мембраны для ионов K^+ , Na^+ и Ca^{2+} ; при этом направление потоков ионов вызывает разряд трансмембранного потенциала. После этого мембрана вновь возвращается в поляризованное состояние, а ионы Ca^{2+} входят внутрь саркоплазматической сети мышечной клетки. Подобный перенос ионов Ca^{2+} осуществляется за счет свободной энергии гидролиза АТФ (АТФ-азный «кальциевый насос» мембраны). Поставщиками АТФ в мышечных клетках служат как гликолиз, так и дыхание. Однако при нарушении этих процессов мышца (скелетная мышца позвоночных животных) при стимуляции продолжает сокращаться благодаря тому, что в ней содержится богатое энергией вещество — креатинфосфат (см. стр. 416), концентрация которого более чем в 4 раза превышает концентрацию АТФ. В мышце идет реакция:



Концевая фосфатная группа АТФ при сокращении мышцы отщепляется и вновь присоединяется к креатинфосфату. При максимальной активности мышц запасы энергии креатинфосфата истощаются. Быстрый гидролиз АТФ при сокращении увеличивает концентрацию АДФ, стимулирующую перенос электронов в дыхательной цепи. Часть АДФ превращается в АМФ



который стимулирует гликолиз.

Чтобы познакомиться с превращением химической энергии АТФ в осмотическую работу клеточных мембран, рассмотрим активный транспорт через мембрану [3, 8, 14]. Клеточная мембрана непроницаема для большинства полярных молекул. Для клеток характерно наличие специфических систем переноса, обеспечивающих проникновение некоторых типов веществ через мембрану. Перемещение веществ через мембрану с помощью специальных систем называют опосредованным переносом. Как правило, вещества транспортируются через мембрану по градиенту концентрации (т. е. в сторону более низкой концентрации), это — пассивный перенос (например, перенос глюкозы в эритроцитах). Наиболее важен для клетки перенос против градиента концентрации, т. е. в направлении более высокой концентрации (активный перенос). Рассмотрим некоторые термодинамические основы активного переноса, а именно, какое количество энергии обеспечивает перенос растворенных веществ против градиента концентрации.

Увеличение концентрации сопровождается уменьшением энтропии (распределение молекул становится менее хаотичным), что, как известно, не может протекать самопроизвольно (см. стр. 407). Однако активный перенос растворенных веществ возможен, если он сопряжен с другой реакцией, идущей с уменьшением свободной энергии, например с гидролизом АТФ, но при этом должен существовать механизм, обеспечивающий передачу свободной энергии гидролиза АТФ процессу переноса вещества. Сложнее, если растворенное вещество заряжено. Уравнение, описывающее изменение свободной энергии в процессе переноса такого вещества, зависит от градиента концентраций и градиента электрического заряда (или потенциала):

$$\Delta G = RT \ln (C_2/C_1) + zF\Delta\psi$$

где C_1 — низкая концентрация вещества, C_2 — высокая концентрация вещества, $zF\Delta\psi$ — изменение свободной энергии за счет перемещения электрического заряда (z — заряд растворенной молекулы, F — число Фарадея, $\Delta\psi$ — трансмембранный потенциал).

При подсчете суммарной эффективности механизмов активного переноса через мембрану, составляющей всего 10—20% от теоретически возможного, следует указать, что на точность расчета влияет сложность определения трансмембранного потенциала. Кроме того, надо учитывать, что значительная часть свободной энергии теряется при переходе транспортируемого вещества в направлении градиента концентрации.

В основе представления об активном транспорте через мембрану лежит тот факт, что удаление какого-то одного вещества из клетки является движущей силой активного переноса других веществ. Так, активный перенос ионов Na^+ из клетки («натриевый насос») приводит к образованию градиента концентрации этих ионов, направленного внутрь клетки, который и обуславливает активный перенос ионов калия, глюкозы и аминокислот внутрь клетки. Если удаление ионов Na^+ из клетки не компенсируется поступлением внутрь других ионов, по-видимому, происходит возникновение градиента электрического потенциала («электрогенный насос»). Предполагают, что этот тип натриевого насоса является первичным механизмом при возникновении трансмембранного потенциала в мышечных клетках (обеспечение действия «кальциевого насоса») (см. стр. 430). Необходимо отметить, что все системы переноса через мембрану работают за счет энергии АТФ или других носителей энергии.

Одной из самых распространенных систем переноса у высших клеток является $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -АТФ-аза. Перенос идет в две стадии. На первой стадии наблюдается фосфорилирование фермента за счет АТФ и связывание внутриклеточного Na^+ (ингибитор Ca^{2+}). На второй стадии (стимулятор K^+) происходит гидролиз фосфорилированного фермента и освобождение ионов Na^+ снаружи мембраны.

Необходимо отметить, что «натриевые насосы» как системы активного транспорта характерны для структурных мембран клетки, первыми принимающими на себя воздействие внешней среды и не требующими для функционирования высокого электрического сопротивления. Иначе обстоит дело с сопрягающими мембранами, выполняющими главную функцию — аккумулярование энергии — и требующими высокого электрического сопротивления [15, 33]. В этом случае действуют протонные насосы, которые служат главными узлами механизма сопряжения процессов окисления и фосфорилирования при генерации мембранного потенциала дыхательной цепью и АТФ-азой. При этом одна система разделяет водород на H^+ и I , а вторая — молекулу H_2O , гидролизующей АТФ, на H^+ и HO^- .

Следует также отметить, что трансформируемая мембранами при переносе электронов и гидролизе АТФ энергия может полностью рассеиваться в виде тепла. Считают, что в клетках существуют механизмы, функции которых сводятся к освобождению энергии в виде тепла (свободное окисление) [14].

РЕГУЛЯЦИЯ МЕТАБОЛИЗМА В КЛЕТКЕ

В живом организме множество различных химических процессов протекает согласованно благодаря наличию сложнейшей саморегулирующейся системы, которая обеспечивает необходимую сопряженность процессов обмена веществ и заставляет клетку функционировать с максимальной эффективностью.

В настоящее время практически невозможно представить, каким образом в целом организме или даже в отдельных клетках происходит тонкое согласование, саморегуляция всех протекающих процессов обмена веществ.

Регуляторные механизмы, по-видимому, действуют как в пределах одной клетки, так и между клетками, далеко отстоящими друг от друга. В отличие от низших форм высокоорганизованные организмы обладают дополнительными регуляторными механизмами — нервной и гормональной системами.

Известно, что химические реакции, протекающие в клетке, катализируются ферментами, поэтому предполагают, что регуляция в животном организме возможна на уровне непосредственного влияния различных факторов на скорость ферментативных реакций и биосинтез ферментов. Различают два основных типа регуляции клеточного обмена:

1) регуляция активности ферментов непосредственно при их участии в ферментативной реакции (ингибирование или активирование ферментативной активности);

2) регуляция биосинтеза ферментов (индукция или репрессия процесса биосинтеза белков-ферментов), осуществляемая на генетическом и рибосомальном уровнях.

Эти два типа регуляции связаны между собой и являются частью общей системы. Изменение активности ферментов приводит к более быстрой и чувствительной регуляции, чем в случае изменения количества ферментов.

Под системой регулирования метаболической цепи понимают те дополнительные взаимодействия, которые связывают воедино ферменты метаболической цепи и координируют их работу. Эта система функционирует таким образом, что управляемый цикл ферментативных реакций сохраняет состояние устойчивого равновесия при разнообразных воздействиях и непрерывно поддерживает концентрацию промежуточных и конечных продуктов этих реакций на «определенном» уровне. Как правило, это достигается за счет синхронизации скоростей превращения и синтеза метаболита.

Синтез любого вещества в организме является многостадийным процессом и осуществляется с помощью полиферментных систем, в каждую из которых входит ряд ферментов и коферментов, катализирующих отдельные реакции в цепи превращений. Действие каждого фермента строго координировано с действием других ферментов, причем продукт одной реакции является субстратом следующей за ней ферментативной реакции.

В некоторых полиферментных системах ферменты действуют независимо друг от друга (ферменты цитоплазмы). В этом случае субстраты переходят от одного фермента к другому благодаря высокой степени специфичности фермента к определенному субстрату.

Регулирование и координация каталитического действия отдельных ферментов в многостадийных процессах может осуществляться также путем образования полиферментных систем, в которых ферменты ассоциированы друг с другом и функционируют совместно в форме ферментных комплексов. Такие комплексы с трудом распадаются на отдельные ферменты, причем после диссоциации становятся неактивными. Примером такой сложной мультиферментной системы может служить дрожжевая синтетаза, катализирующая синтез высших жирных кислот. Она представляет собой комплекс, состоящий из семи различных ферментов.

Существуют и более высокоорганизованные ферментные системы, которые связаны с надмолекулярными структурами — мембранами и рибосомами. Так, оксидоредуктазы дыхательной цепи, в которой происходят процессы переноса водорода и электронов от промежуточных продуктов цикла трикарбоновых кислот к молекулярному кислороду, связаны с внутренней мембраной митохондрий и являются частью ее структуры [3].

Скорость многостадийного процесса, протекающего в полиферментной системе, зависит от концентрации промежуточных продуктов, а также от концентрации соответствующего фермента и кофактора. Скорость каждой стадии определяется стационарной концентрацией данного промежуточного продукта, а также концентрацией соответствующего фермента. Стационарная концентрация всех промежуточных продуктов, а также кофакторов определяется соотношением скоростей их образования и потребления и зависит не только от активности одной какой-то ферментативной системы, но и от скоростей других ферментативных реакций, в которых эти соединения используются.

В метаболических последовательностях существует какая-то одна реакция, скорость которой определяет скорость всей системы, причем ли-

митирующим фактором может быть либо концентрация фермента, либо концентрация субстрата.

На активность ферментов в организме, а следовательно на скорость ферментативной реакции, влияет ряд факторов: сродство к субстрату, константа Михаэлиса, температура, рН среды, концентрация субстрата и различных кофакторов, необходимых для действия ферментов, наличие активаторов и ингибиторов.

Особую роль в регулировании активности ферментов играют коферменты. Так, некоторые дегидрогеназы обладают различным сродством к окисленным и восстановленным формам коферментов. Кроме того, одни и те же коферменты могут как активировать ферменты внутри одной цепи, так и функционировать между различными цепями реакций. Так, взаимосвязь между циклами Кребса, окисления жирных кислот и других происходит не только через промежуточные метаболиты, но и за счет общих коферментов — НАД, НАДФ, КоА-SH, ФАД и др. Перечисленные кофакторы находятся в клетке в значительно меньшем количестве, чем это необходимо для ферментативных реакций, в которых они участвуют. Эти коферменты связывают различные циклы между собой и приводят к взаимодействию, основанному на конкуренции за коферменты.

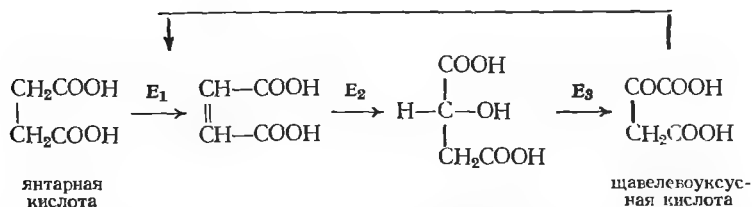
В случае отсутствия в организме достаточного количества коферментов и кофакторов активность ферментов снижается. Известно, что синтез коферментов осуществляется в организме человека и животных на основе поступающих в него витаминов. И в том случае, если в пище отсутствует этот существенный компонент, кофермент не образуется и апофермент остается каталитически неактивным, что в свою очередь приводит к паталогическим изменениям (авитаминозам и гиповитаминозам). При добавлении в пищу соответствующих витаминов происходит превращение их в коферменты и восстановление нарушенных ферментативных процессов. По-видимому, лечебное действие витаминов основано на регулировании активности соответствующих ферментов в животном организме.

Активность фермента зависит от концентрации субстрата, участвующего в ферментативной реакции. При стационарном состоянии реакции субстрат поступает с такой же скоростью, с какой он используется в реакции. Повышение концентрации субстрата вызывает ускорение реакции до нового стационарного состояния, где новая скорость реакции соответствует новой концентрации субстрата.

Известны полиферментные системы, в которых скорость ферментативных реакций регулируется концентрацией конечного продукта в цепи последовательных превращений. В основе этого вида регуляции лежит ингибирование (или активация) ферментов первой стадии биосинтеза конечными продуктами реакции, называемое ингибированием (или активацией) по типу обратной связи. Ингибиторы и активаторы, действующие по принципу обратной связи, называются эффекторами.

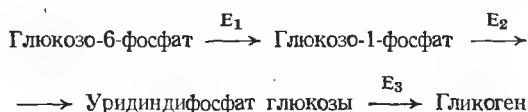
Метаболит может ингибировать или активировать фермент по пути конкурентного или аллостерического взаимодействия. Регулирование биосинтеза может происходить как по типу отрицательной, так и по типу положительной обратной связи.

В цикле Кребса щавелевоуксусная кислота, являющаяся продуктом полиферментной системы, регулирует активность фермента сукцинатдегидрогеназы (E_1), катализирующего реакцию дегидрирования янтарной кислоты:



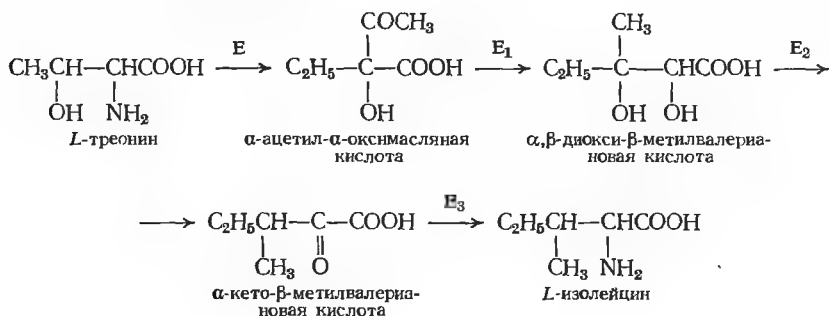
Как только концентрация щавелевоуксусной кислоты достигает определенного значения, ее синтез прекращается вследствие ингибирования сукцинатдегидрогеназы конечным продуктом — щавелевоуксусной кислотой, которая по структуре близка к янтарной кислоте и занимает активный центр фермента сукцинатдегидрогеназы, предназначенный для янтарной кислоты. По мере расходования щавелевоуксусной кислоты ее концентрация уменьшается, что приводит к включению цепи ферментативных реакций. Данный тип регулирования основан на конкурентном ингибировании и осуществляется по типу отрицательной обратной связи.

Примером регуляции биосинтеза по принципу положительной обратной связи является образование гликогена в животных клетках. Синтез гликогена многостадийный; первой реакцией в цепи последовательных превращений является реакция перехода глюкозо-6-фосфата в глюкозо-1-фосфат:



Накопление в клетке глюкозо-6-фосфата стимулирует синтез гликогена, т. е. глюкозо-6-фосфат активирует фермент, катализирующий синтез гликогена на последней стадии биосинтетической цепи из уридиндифосфатглюкозы. В этом случае глюкозо-6-фосфат — начальный субстрат в ферментативной цепи реакции — является активатором фермента последней стадии [28].

Регулирование ферментативной активности по принципу обратной связи возможно и в том случае, когда продукт реакции значительно отличается от субстрата первой ферментативной реакции в цепи биохимических превращений. При этом продукт реакции взаимодействует с особым регуляторным аллостерическим центром, пространственно удаленным от активного центра фермента. Примером такого регулирования может служить полиферментная система, катализирующая превращение *L*-треонина в *L*-изолейцин:



Изменение ферментативной активности белка-фермента (Е) в данном случае связано с изменениями его конформации при взаимодействии с конечным продуктом реакции (L-изолейцином), которые приводят к изменению структуры активного центра фермента. Взаимодействие активного и аллостерического центров носит кооперативный характер.

В результате конформационного превращения при действии продукта реакции по центру регулирования каталитически активный центр становится доступным для субстрата.

Кинетика действия ферментов со специфической аллостерической функцией характеризуется S-образной кривой зависимости начальной скорости реакции от концентрации субстрата или аллостерического эффектора, т. е. изменение скорости реакции происходит в очень малом интервале концентраций эффектора, что обеспечивает ее чувствительность к минимальным сдвигам и устойчивость регуляции.

Ферменты, изменяющие активность за счет аллостерического взаимодействия белка-фермента с эффектором или продуктом реакции, как правило, катализируют начальную стадию последовательных реакций, и их называют регуляторными ферментами. Этим белкам приписывается основная роль в регуляции ферментативной активности и в регуляции синтеза специфических белков.

Регуляторные ферменты, имеющие четвертичную структуру, содержат несколько активных и аллостерических центров. Связывание специфического субстрата на одном из активных центров или связывание эффектора на одном из аллостерических центров вызывает существенные конформационные изменения и связанные с ними изменения свойств остальных активных и аллостерических центров. Для регуляторных ферментов характерна олигомерная структура, т. е. наличие нескольких субъединиц [29]. В каждый активный центр таких ферментов входят функциональные группы от нескольких субъединиц, поэтому изменение агрегатного состояния фермента влияет на активность ферментов: при диссоциации олигомерного фермента на мономеры происходит его инактивация.

Расщепление гликогена до глюкозо-1-фосфата катализируется фосфоорилазой, которая активируется АМФ. Показано, что фосфоорилаза состоит из двух неактивных субъединиц; активной формой фосфоорилазы является димер. АМФ, являясь активатором фосфоорилазы, способствует димеризации. Вероятно, АМФ действует как аллостерический эффектор.

Активность некоторых ферментов регулируется специфическими эффекторами, которые по структуре отличаются от субстрата, кофактора и продукта данной ферментативной реакции. Эффектор присоединяется к белку-ферменту на участке, отличном от участков связывания субстрата и продукта. Примером такой аллостерической регуляции является изменение активности ферментов под влиянием низкомолекулярных гормонов [30].

Помимо аллостерического механизма имеются и другие возможности изменения активности белка-фермента. Фермент может существовать в двух равновесных формах, и активатор будет стабилизировать активную форму [31]. Одним из путей управления ферментативными реакциями является возможность изменения свойств фермента при образовании им комплексов с определенными белками. Например, в сыворотке крови содержится два ингибитора трипсина с разным сродством к ферменту. Они образуют с ним комплексы, обладающие различной протеолитической активностью. В комплексе с ингибитором II трипсин полностью инак-

вируется, а при соединении с ингибитором I лишь сужается специфичность трипсина, сохраняется активность только по отношению к некоторым субстратам (протамин).

Кроме механизмов, регулирующих активность ферментов, существуют механизмы, которые определяют количество синтезируемого фермента. Изменение количества фермента представляет собой один из наиболее решающих факторов в регуляции обмена веществ. Речь идет не только о регулировании скорости биосинтеза ферментов, но и о взаимопревращении активной и неактивной форм фермента.

Как известно, специфическая структура каждого белка-фермента определяется геном, т. е. специфической молекулярной структурой ДНК в соответствующем участке хромосомы. В настоящее время предложен механизм регуляции биосинтеза белков-ферментов, основанный на явлениях индукции и репрессии (см. кн. I, стр. 490).

В основе этой регуляции лежит принцип обратной связи. Сигналы обратной связи, управляющие деятельностью макромолекул, передаются обычно с помощью малых, быстро диффундирующих молекул. Репрессором может служить конечный продукт в метаболической цепи, индуктором — продукт реакции.

Почти во всех изученных системах с репрессией и индукцией по типу обратной связи обнаружена непрерывная зависимость количества фермента от концентрации репрессора или индуктора в широком диапазоне изменения последней.

Как при индукции, так и при репрессии ферментов малые молекулы метаболита не вызывают повышения или подавления ферментативной активности; они действуют на генетический локус, контролирующий синтез данного фермента.

Роль метаболита при репрессии биосинтеза сводится, по-видимому, к аллостерическому соединению с белком-репрессором. При этом репрессор изменяется так, что он уже не может взаимодействовать с геном-оператором. Таким образом, перепроизводство конечного продукта данного метаболического пути влечет за собой активацию репрессора и, следовательно, снижение скорости синтеза ферментов, необходимых для данного метаболического пути.

Как и в случае репрессии, механизм индукции может быть реализован посредством изменения скорости синтеза белка-фермента или превращения готового неактивного предшественника в фермент. Кроме того, субстрат фермента также может при известных условиях связываться с молекулой специфического белка (репрессора) и действовать в качестве индуктора, «включая» структурный ген, контролирующий синтез того фермента, для которого данный субстрат является компонентом индуктора.

К индукции ферментов может привести и изменение самых различных факторов, начиная от стереоспецифических субстратов и общих изменений среды, например температуры, до введения в сферу влияния гормонов и лекарственных веществ.

Клетка синтезирует лишь те белки, которые ей необходимы в данный момент. Под действием факторов внешней среды клетка прекращает биосинтез одних ферментов и синтезирует необходимые ей другие ферменты. Например, при остром дефиците незаменимых аминокислот в клетках происходит синтез изофермента альдолазы с измененным аминокислотным составом, но способным катализировать ту же самую реакцию.

Бактерии кишечной палочки *E. coli* в нормальной среде содержат в очень незначительном количестве фермент β -галактозидазу, расщепляющий лактозу. При добавлении в питательную среду лактозы происходит значительное увеличение количества этого фермента, т. е. лактоза индуцирует синтез β -галактозидазы.

Как у животных, так и у человека обнаружена индукция ферментов в ответ на поступление в организм чуждых ему веществ. В этом случае индукция сопряжена с развитием защитных механизмов организма. Введение лекарственных веществ индуцирует ферментные системы, приводящие к трансформации и деградации этих соединений. Этим можно объяснить наблюдающееся часто привыкание к некоторым лекарственным веществам при длительном их применении [32].

Как известно, ряд ферментов синтезируется в организме в неактивной форме предшественника фермента. В этом случае специфический белок-фермент образуется из неспецифического белка-предшественника, еще неспособного выполнять каталитическую функцию, и его превращение в биокатализатор происходит под влиянием субстрата, который играет ведущую роль в соответствующей перестройке специфического белка в фермент. Появление ферментативной активности в данном случае может быть сопряжено с изменением конформации полипептидной цепи, агрегацией субъединиц фермента, разрушением специфического ингибитора ферментов. Протеолитические ферменты, катализирующие различные процессы пищеварения в желудочно-кишечном тракте, например трипсин и химотрипсин, синтезируются в неактивной форме в виде трипсиногена и химотрипсиногена. Активация их происходит за счет протеолиза, катализируемого ферментом трипсином. Как видно, трипсин активирует префермент и регулирует необходимое количество активной формы фермента.

Важную роль в регуляции жизненных функций организма играют изоферменты, т. е. генетически обусловленные множественные молекулярные формы ферментов. Изоферменты, одинаковые по специфичности действия, различаются регуляторными свойствами. Они дифференцированно отвечают на сигналы высших регуляторных систем, функционируют в различных физиологических условиях.

Примером клеточной дифференцировки могут служить реакции, катализируемые изоферментами лактатдегидрогеназы в различных физиологических условиях. Показано, что лактатдегидрогеназа, находящаяся в мышцах, для которых характерен интенсивный гликолиз, обладает сильным сродством к пировиноградной кислоте и высокой активностью в процессе реокисления восстановленного НАД пировиноградной кислотой, в результате которого образуется молочная кислота. Лактатдегидрогеназа ткани, для которой характерно активное дыхание («аэробные мышцы»), обладает меньшим сродством к пировиноградной кислоте и менее активно катализирует реакцию реокисления восстановленного НАД, что дает ему возможность окисляться аэробным путем в митохондриях с образованием богатых энергией соединений.

В последнее время показано, что в процессе естественного старения организма происходит количественная и качественная модификация изоферментов, которая приводит к изменению биохимических свойств ферментов, сопровождающемуся уменьшением каталитической активности.

Определенную регуляторную роль при протекании ферментативных процессов в клетке выполняют субклеточные структуры, с которыми связаны отдельные ферменты и полиферментные системы, определенным

образом локализованные внутри клетки. Активность таких ферментов зависит от состояния этих структур. Любое изменение связи между ферментом и субклеточной структурой или изменение конформации связанного белка-фермента приводит к изменению активности этого фермента.

Ферменты и промежуточные продукты обмена веществ неравномерно распределены в отдельных элементах клеточной структуры. Упорядоченному движению молекул внутри клетки способствует высокая степень избирательности клеточной мембраны. Транспорт веществ через биологические мембраны, представляющие собой генетически детерминированные структуры, в которых заложена информация относительно тех процессов, выполнение которых они обеспечивают, является ферментативным процессом и обусловлен активностью мембранных ферментов.

Внутри клетки существуют мембранные барьеры, которые выполняют определенную регулирующую роль в протекающих ферментативных реакциях. Направленное перераспределение компонентов метаболических систем в клетке зависит от концентрации веществ, а также от проницаемости мембран.

На проницаемость мембраны могут влиять различные факторы. Так, инсулин повышает проницаемость плазматической мембраны мышечных клеток для глюкозы, стимулируя транспорт глюкозы из крови и межклеточных пространств внутрь клеток скелетной и сердечной мышцы и жировой ткани. При интенсивном течении процессов окислительного фосфорилирования, приводящих к накоплению больших количеств АТФ, внутри митохондрий происходит взаимодействие АТФ с актомиозинподобным белком мембран, сопровождающееся конформационными изменениями белка. А это в свою очередь приводит к сокращению митохондриальных мембран и уменьшению их проницаемости, т. е. к снижению скорости транспорта веществ через мембрану митохондрий. С уменьшением концентрации АТФ внутри митохондрий проницаемость мембран увеличивается. По-видимому, митохондриальная мембрана участвует в регуляции энергетического обмена клетки.

Примером регулирующего влияния субклеточных структур в клетке является гликолитическая система, основные компоненты которой размещены в различных клеточных пространствах. Коферменты и эффекторы находятся в субклеточных структурах, а ферменты — в цитоплазме. Обособленная локализация коферментов и апоферментов гликолиза в клетке дает предпосылки для тончайшей функциональной согласованности. Действие цикла обеспечивается механизмами, вызывающими перемещение коферментов гликолиза из митохондрий и ядра в гиалоплазму — гликолитическое пространство клетки. Одновременно через наружную плазматическую мембрану внутрь клетки поступают субстраты гликолиза и окисления, а также гормоны, управляющие активностью некоторых ферментов. Метаболиты, циркулирующие между митохондриями и гликолитическим пространством клетки, обеспечивают согласованную деятельность дыхательного и гликолитического фосфорилирования.

Благодаря сведению разнообразных химических процессов в единую соподчиненную систему клетка способна к саморегулированию и к поддержанию структуры и функций в условиях изменяющейся окружающей среды.

ЛИТЕРАТУРА

1. Малер Г., Кордес Ю. Основы биологической химии. Пер. с англ. Под ред. А. А. Баева, Я. М. Варшавского. М., «Мир», 1970. 567 с.
2. Вилли К., Детье В. Биология. Пер. с англ. М., «Мир», 1974. 822 с.
3. Ленинджер А. Биохимия. Пер. с англ. Под ред. А. А. Баева, Я. М. Варшавского. М., «Мир», 1974. 957 с.
4. Дэгги С., Никольсон Д. Метаболические пути. Пер. с англ. Под ред. Н. С. Кулаева. М., «Мир», 1973. 310 с.
5. Биогенез природных соединений. Пер. с англ. Под ред. Л. М. Гиномдана. М., «Мир», 1965. 723 с.
6. Косовер Э. Молекулярная биохимия. Пер. с англ. Под ред. А. Е. Брауништейна. Я. М. Варшавского. М., «Мир», 1964. 336 с.
7. Грин Д., Гольдбергер Р. Молекулярные аспекты жизни. Пер. с англ. Под ред. Я. М. Варшавского. М., «Мир», 1968. 400 с.
8. Ясайтис А. А. Биофизика. Итоги науки и техники. Т. 3. М., Изд. ВИНТИ, 1973. 171 с.
9. Скулачев В. П. Аккумуляция энергии в клетке. М., «Наука», 1969. 440 с.
10. Ленинджер А. Митохондрия. Пер. с англ. М., «Мир», 1966. 316 с.
11. Волькенштейн М. В. Молекулы и жизнь. М., «Наука», 1965. 504 с.
12. Живая клетка. Пер. с англ. Под ред. Г. М. Франка. М., «Мир», 1962. 223 с.
13. Стромберг А. Г., Семченко Д. П. Физическая химия. М., «Высшая школа», 1973. 479 с.
14. Скулачев В. П. Трансформация энергии в биомембранах. М., «Наука», 1972. 199 с.
15. Пюльман Б., Пюльман А. Квантовая биохимия. Пер. с англ. Под ред. Л. А. Блюменфельда. М., «Мир», 1965. 654 с.
16. Дэвис Д., Джованелли Дж., Рис Т. Биохимия растений. Пер. с англ. Под ред. В. Л. Кретовича. М., «Мир», 1966. 512 с.
17. Кулаев Н. С. Неорганические полифосфаты и их физиологическая роль. М., «Наука», 1975. 31 с.
18. Сент-Дьердьи А. Биоэнергетика. Пер. с англ. Под ред. Л. А. Темермана. М., Физ.-мат. лит., 1960. 155 с.
19. Введение в субмолекулярную биологию. Пер. с англ. М., «Наука», 1960. 139 с.
20. Диксон М., Узбб Э. Ферменты. Пер. с англ. Под ред. А. И. Опарина. М., Издательство, 1961. 728 с.
21. Рэкер Э. Биоэнергетические механизмы. Пер. с англ. Под ред. С. А. Нейфаха. М., «Мир», 1967. 291 с.
22. Михлин Д. М. Биохимия клеточного дыхания. М., Изд. АН СССР, 1960. 56 с.
23. Ригель Дж. Энергия, жизнь и организм. Пер. с англ. Под ред. В. А. Яковлева. М., «Мир», 1967. 168 с.
24. Кребс Г., Корнберг Г. Превращение энергии в живых системах. М., «Наука», 1959. 173 с.
25. Арнон Д. И. В сб.: Международный биохимический конгресс. IV симпозиум. М., Изд. АН СССР, 1961, с. 202—203.
26. Любимов В. И. Усп. биол. хим., 1965, т. 7, вып. 3, с. 176—179; в сб.: IV Международный биохимический конгресс. Тезисы докладов I—IV секции. М., «Наука», 1972, с. 325—330.
27. Метун Д. В кн.: Биогенез природных соединений. Пер. с англ. М., «Мир», 1965, с. 9—11; Mourad N., Parks P. E. Biophys. Res. Comm., 1965, v. 19, p. 312.
28. Кретович В. Л. Введение в энзимологию. М., «Наука», 1967. 351 с.
29. Курганов Б. И., Поляновский О. Л., Журн. ВХО им. Д. И. Менделеева, 1971, т. 16, № 4, с. 421—430.
30. Химические факторы регуляции активности и биосинтеза ферментов. Под ред. Ореховича В. Н. М., «Медицина», 1969. 396 с.
31. Аллостерическая регуляция действия ферментов. Под ред. Кретовича В. Л. М., Изд. ВИНТИ, 1971. 235 с.
32. Крицман М. Г., Коникова А. С. Индукция ферментов в норме и патологии. М., «Медицина», 1968. 314 с.

ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

- АВО система групп крови 93, 97
 Агглютинины (Антитела) 91 сл., 93, 95
 Агглютиногены (Антигены) 93, 94 сл.
 S-Аденозилметионин 417
 Аденозиндифосфат (АДФ) 408, 414 сл., 419, 430
 Аденозинтрифосфат (АТФ) 64, 408, 414 сл., 419, 427, 430
 свободная энергия гидролиза 412, 413, 415
 Адипиновая кислота, эфир 214
 Аккумуляторы энергии 413
 Аконитаза [Цитрат(изоцитрат)—гидро-
 лаза, Аконитатгидратаза] 400
цис-Аконитовая кислота 399 сл.
 Актин 430
 Актомиозин 430
цис-1-О-(Алкен-1-ил)-2-ацил-3-галоген-3-
 дезоксиглицерин 297 сл.
 1-О-(Алкен-1-ил)-2-ацилглицерин 296
цис-1-О-(Алкен-1-ил)-2-ацил-*sn*-глицеро-
 3-фосфаты 296
 Алкенилглицерин 253 сл.
 Алкенилглицерофосфорилхолин-гидрола-
 за 364
цис-1-О-(Алкен-1-ил)-*sn*-глицидолы 297
транс-1-О-(Алкен-1-ил)-2,3-диацил-*sn*-
 глицерин 254
 1-О-Алkil-2-ацилглицерин 249
 1-О-Алkil-2,3-диацилглицерин 249
 Алкилдихлорфосфаты 276
 Алкилдентрифенилфосфораны 214
 Алкогольдегидрогеназа 70
 D-Аллоза 11
 Аллоинозит 300
 Альгиновая кислота 63
 Альдозы 10, 11, 40
 Альдолаза 437
 Альдоновые кислоты 21
 Альдотриозофосфат 419, 420, 421
 D-Альтроза 11
Амадори перегруппировка 77
 Амидинфосфаты (Фосфогены) 414, 416
 Амилазы 68, 394
 Амилоза 61, 67
 Амилозо-1,6-глюкозидаза 62, 68
 Амилопектин 61, 68
 Аминогруппы защита 40, 55, 278, 279, 286, 298
 2-Амино-2-дезоксид-*D*-глюкоза 21
 2-Амино-2-дезоксид-*D*-глюкозо-6-фосфат 66
 4-О-(2-Амино-2-дезоксид-β-*D*-глюкопира-
 нозил)-2-амино-2-дезоксид-*D*-глю-
 копираноза см. Хитобиоза
 3-Амино-3-дезоксид-1,2;5,6-ди-О-изопропил-
 иден-α-*D*-аллофураноза 337
 2-Амино-2-дезоксидсахара 40
D-эритро-2-Амино-1,3-диоксиоктадекан
 (Дигидросфингозин) 325
D-эритро-2-Амино-1,3-диокси-*транс*-ок-
 тадецен-4 см. Сфингозин
 2-Амино-1,3-диолы 333
 α-Амино-β-кетoadипиновая кислота 143
 Аминокислоты 218
 δ-Аминолевулиновая кислота 143
 α-Амино-β-оксидстеариновые кислоты 324, 325
 α-Амино-β-оксокислоты 334
 2-Амино-3-оксо-1-оксооктадекан (3-Де-
 гидросфингтанин) 336
 Аминосакхара 10, 40
 Аминоспирты 218, 332
 2-Амино-1,3,4-триоксооктадекан 325
 Аминоэтилфосфонилцерамиды 339
 Амфиболические пути обмена веществ 393
 Анаболизм 391, 393, 429 сл.
 Анаплеротические пути обмена веществ 393
 Анаэробный (гликолитический) тип об-
 мена 408
 Ангидрид Бригля (3,4-6-Три-О-ацетил-
 1,2-ангидроглюкоза) 52
 Ангидросакхара 52
 Анемии наследственные 145, 146, 147
 Аномерный (гликозидный) центр 13
 Аномерный эффект 19
 Аномеры 13
 Антиген Rh (Резус-фактор) 94
 Антигены (Агглютиногены) 93, 94 сл.
 Антикоагулянты 87
 Антимицин 155
 Антирезус-агглютинины 94

- Антитела (Агглютинины) 91 сл., 93, 95
 Аполипопротеиды 370
 D-Арабиноза 11, 20
 L-Арабиноза 40, 43, 66
 Арахидоновая (эйкозатетраен-5,8,11,14-овая) кислота 181, 193
 биосинтез 350
 синтез 208—211
 Арахидоновая (*n*-эйкозановая) кислота 191, 202
 Аргининфосфат 416
 Арндта—Эйстерта реакция 206
 Атеросклероз 382
 Атропизомеры 15
 Ацетали сахаров 24
 Ацетальная защита 236
 N-Ацетил- β -D-гексозаминидаза 97
 Ацетилениды металлов 211
 Ацетиленовые углеводороды 208 сл.
 Ацетилимидазол 418
 Ацетилкофермент А (Ацетил-КоА) 65, 70, 143, 346, 399, 417
 Ацетил-КоА:дегидролипид — S-ацетил-трансфераза (Липидат — ацетил-трансфераза) 399
 N-Ацетилнейраминная кислота 46, 344
 α -N-Ацетилнейраминил- β -D-галактопиранозил-(1 $\rightarrow$ 4)-D-глюкопиранозиды 58, 59
 α -Ацетил- α -оксимасляная кислота 435
 Ацетилтрансацилаза 348
 N-Ацетил-2,3,4-триметил-О-ацетил- β -D-ксилопиранозиламин 32
 Ацетилфосфат 414, 417
 N-Ацетилфосфатидальэтаноламины 265
 Ацетилхолин 414, 417
 Ацилалли сахаров 24
 Ацилгалогенозы 27, 50 сл.
 Ацилглицозилгалогениды 19
 3-О-Ацил-*sn*-глицерин 247
 Ацилкардиолипид альдегидогенный (Ди-фосфатидальацилглицерин) 299
 Ацилкарнитин 398
 Ацил-КоА-дегидрогеназы 351
 Ацил-КоА:моноглицеридацилтрансфераза 353
 Ацил-КоА-синтетазы 351
 Ацил - КоА-холестерол-ацилтрансфераза 354
 Ацилпереносящий белок 348
 2-О-Ацил-3-О-(тетрагидропиранил-2)-глицерин 247
 N-Ацилфосфатидальэтаноламины 265
 Ацилфосфаты 276, 414, 416
 Ацильная миграция 233, 332
 Аэробный тип обмена 408
- Байера**—Фишера номенклатура глицеринов 221, 224
 Бактеремия менингококковая 92
 Бактериометилфеофорфид 178
 Бактериородопсин 181
 Бактериохлорин 102
 Бактериохлорофилл 102, 165, 166, 178
- Батилловый спирт (1-О-Октадецилглицерин) 249
 Батородопсин (Преломиродопсин) 182
 Бегеновая (*n*-докозановая) кислота 191, 202
 Бензиламин 336
 1-Бензил-2-трет-бутил-3-иод-3-дезоксис-*sn*-глицерин 290
 Бензил-*sn*-глицерины 239, 242, 245, 246, 247, 251
 3-О-Бензил-D-глюкоза 21
 1,3-Бензилдиглицерин 238, 244
 Бензилиденовая защита 237
 N-Бензоил-1,3,4,6-тетра-О-ацетилглюкозамин 53
 3-О-Бензоилцерамид 340, 341, 345
 Бенсона модель мембраны 376
 Биладиины-ас 121, 122
 Билены-*b* 119
 Биливердин 148
 Биливердинглобин, железный комплекс (Вердогемоглобин) 148
 Билирубинглобин 148
 Биосинтез
 гемоглобина 146
 глобина 145
 жирных кислот 197, 346 сл.
 липидов 352 сл., 362 сл.
 олигосахаридов 56 сл.
 порфиринов 142 сл., 145
 регуляция 434 сл.
 углеводов 64 сл.
 хлорофиллов 179 сл.
 Биоэнергетика молекулярная 406 сл.
 1,3-Бис(1,2-диацил-*sn*-глицерофосфофил)глицерин 293
 Бис(диметилметоксисил)амид калия 341
 1,19-Бис(карбо-трет-бутокс)билены-*b* 120
 5,5'-Бис(метоксиметил)дипиррилметен 119
 Бора эффект 135, 137 сл.
 Борнезит 217, 302, 314
 Бредерка реакция 50
 Брожение 418
 2-(1-Бромалкил)-1,3-диоксоланы 258
 5-Бром-5'-бромметилдипиррилметен 121
 1-Бром-19-метил-1,19-дидезоксибиладиины-ас 121
 α -Бром- α' -метилдипиррилметен 113, 114
 2-Бромэтилхлорфосфонат 321
n-Бутановая (масляная) кислота 191
 2-трет-Бутил-1,3-дидеоксид-1,3-дидезоксиглицерин 290
 Бэрри метод 83
- Вакценовая кислота 201, 350
 Вант-Гоффа принцип 30
 Вердогемоглобин (Биливердинглобина железный комплекс) 148
 Вильштеттера формула порфина 128
 Винилпорфирины 118
 Витамин В₁₂ (Цианкобаламин) 104, 148
 Виттига реакция 214
 Высокоэнергетические соединения 413 сл.

- Галактин 314
 Галактоза 11, 39, 40, 42, 66
D-Галактозамин 44
 Галактозидазы 356, 396, 438
 Галактозилглюкозилдиглициериды 261
 Галактозилдиглициерид [1,2-Ди-О-ацил-3-О-(β -*D*-галактопиранозил)-*sn*-глицерин] 260, 261, 354, 356
 Галактозилтрансфераза 356
 Галактолипазы 356
 3-О- β -Галактопиранозил-*D*-арабопираноза 56
 β -Галактопиранозил-(1 $\rightarrow$ 3)- β -*D*-N-ацетилгалактозаминил-(1 $\rightarrow$ 4)- β -*D*-галактопиранозил-(1 $\rightarrow$ 4)-*D*-глюкопираноза 59
 1-О-(β -*D*-Галактопиранозил)-2-N-ацил-4-сфингенины 342
 3-О- β -*D*-Галактопиранозил-*sn*-глицерин 259
 6-О- α -*D*-Галактопиранозил-*D*-глюкоза см. Мелибиоза
 4-О- β -*D*-Галактопиранозил-*D*-глюкопираноза см. Лактоза
 α -*D*-Галактопиранозил-(1 $\rightarrow$ 6)- α -*D*-глюкопиранозил- β -*D*-фруктофуранозид см. Раффиноза
 4-О-(β -*D*-Галактопиранозил)-*D*-манноза 55
D-Галактуроновая кислота 45, 66
 Галогенацетали глицерина 253, 254
 Ганглиозиды 59, 344
 Гапены 94 сл.
 Гаптоглобин 91
 Гексатидропорфин 102
n-Гексадекановая (пальмитиновая) кислота 191, 349
 4-Гексадекасфингенин 339
 Гексадеценоилхлорид 335
 1-О-Гексадецилглицерин (Химиловый спирт) 249
 2-(Гексадин-2,5-илокси)-тетрагидропиран 209
n-Гексаксидановая кислота 191
n-Гексановая (капроновая) кислота 191
 Гексапиранозы 20
 Гексозомонофосфатный (пентозофосфатный, фосфоглюконатный) путь (Пентозный цикл) 68, 426
D-арабино-3-Гексулоза 22
 Гем 104, 105, 145
 Гем α 151, 154
 Гем α_2 165
 Гематиновая кислота, нмид 128, 142, 153, 170
 Гематозиды 344, 368
 Гематопорфирин 102, 111, 126, 158, 159
 Гематопорфирин IX 102, 116
 диметиловый эфир 107
 Гематопротеолипид 379
 Гем-гемное взаимодействие 135, 136 сл.
 Гемин 104, 126 сл., 151
 Гемин α (Цитогемин) 152
 Гемицеллюлозы 64
 Гемоглобин(ы) 104, 125 сл., 132 сл., 157
 Гемоглобин(ы)
 аномальные 132
 биосинтез 146
 катаболизм 148 сл.
 реакция с O_2 135 сл.
 физиологические функции 135 сл.
 A 129
 F 131
 S 146
 Гемопептиды 159, 161
 Гемопиррол 126, 170
 Гемопирролкарбоновая кислота 127
 Гемопротейд 160, 161
 Гемохромы 105
 Гем-синтетаза (Феррохелатаза) 145
 Генетический контроль биосинтеза Hb 146
 Ген-оператор 437
 Гены 146 сл.
 аллельные 96 сл.
 Гепарин 78, 84, 86
 β -Гепарин (Хондроитинсульфат В, Дерматансульфат) 89
 Гепаритин-сульфат 87
 α -Генциобиоза, октаацетат 50
 Гептадекасфингенин 329
D-глицеро-*D*-глюко-Гептоза 22
 Гетероглилканы 60
 Гиалибууроновая кислота [3-О-(β -*D*-глюкопирануранозил)-2-амино-2-дезоксид-*D*-глюкопираноза] 48, 58, 79, 88
 Гиалоплазма 439
 Гиалуронидаза 88
 Гиалуроновая кислота 79, 84, 87
 Гиднокарповая [11-(циклопентен-2-ил)-ундекановая] кислота 195, 202
 Гидразоны сахаров 24
 Гидроксильная группа
 защита 50, 54, 236, 238, 310 сл.
 реакции 24 сл.
 Гидролаза(ы) 57, 394
 эфиров глицерина см. Липаза панкреатическая
 Гидролиз
 гликозидов 77 сл.
 олигосахаридов 56 сл.
 сахаров 56 сл.
 Гипсородопсин 182
 Гирке болезнь 62
 Гликоген 62, 394, 435, 436
 Гликогидролазы 79
 Гликодезоксикселевая кислота 396
 Гликозаминогликуроноглилканы 73
 Гликозидазы 79
 Гликозидная связь 50 сл., 56, 77
 Гликозидный гидроксил 13, 26 сл.
 Гликозидный (аномерный) центр 13
 Гликозиды 23, 51, 53, 77 сл.
 Гликолиз 68 сл., 418, 419 сл., 430
 Гликолипиды 259 сл., 262 сл., 354, 355
 Гликолипептиды 264
 Гликолитический (анаэробный) тип обмена 408
 Гликопептиды 73, 76, 77 сл.
 Гликопротеины 9, 73, 90 сл.

Гликофинголипиды 341, 367
 Гликофосфолипиды 265, 319 сл.
 Гликохолевая кислота 396
 Глицеральдегид-3-фосфатдегидрогена-
 за 68
 Глицераткиназа 230
 Глицериды 225 сл., 228
 криптоактивные 221
 критические пары 188
 полнморфизм 231 сл.
 разделение 188
 реакции 226 сл., 228
 синтез 233 сл.
 структура 230 сл.
 Глицерин 216, 234, 236
 номенклатура производных 221
 стереохимия производных 219 сл.
 1,2-циклокарбонат 241
 эфиры 238, 240—243, 246
D-Глицериновый альдегид 11, 13
L-Глицериновый альдегид 13, 221
D-Глицеринфосфаты 221
 Глицеродифосфат, соль 299
 Глицерокиназа 353
 Глицеролиз 236, 244
 Глицерофосфат-ацилтрансфераза 353
 Глицерофосфатдегидрогеназа 353
sn-Глицерофосфаты 224, 225, 353
 Глицерофосфолипиды альдегидогенные
 295
 Глицерофосфорилмиоинозитдифосфаты
 308, 309
 Глицерофосфорилмиоинозиттрифосфаты
 308
1D-1-О-(Глицерофосфорил)-мионнозит-
 4-фосфат 309
3-sn-Глицерофосфорилхолин 281
 Глицерофосфорилэтаноламин 284
 Глицерофосфорная кислота 221
sn-Глицеро-3-(2-хлорэтил)-фосфат 282
 Глицидол 250
N-Глицилфосфатидилэтаноламин 323
 Глидин 143
 Глобин 129 сл., 145
 Глобозиды 344
 Глобулины 84, 90, 91
 Глюкаровая кислота 21
D-Глюкоза 11, 29, 40, 42, 66, 68, 419
 пентаацетат 37
 ПМР-спектр 34
 подвижность 39
 таутомерия 14
D-Глюкозамин 44
α-Глюкозиды 396
 Глюкозилгалактозилглюкозилдиглицери-
 ды 261
N-Глюкозилфосфатидилэтаноламин 319,
 320
D-Глюкозо-1-фосфат 66, 68
 Глюкозо-6-фосфат 68, 70, 419, 426, 435
 Глюкозо-6-фосфатаза 62
D-Глюкозо-6-фосфат-альдокетонизомера-
 за 65
 Глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназа 70
 Глюкокиназа 68
 Глюконовая кислота 21

Глюконолактоназа 70
D-Глюкопираноза 14, 19, 22
 4-О-*α*-*D*-Глюкопиранозил-*D*-глюкопира-
 ноза см. Мальтоза
 4-О-(*β*-*D*-Глюкопиранозил)-*D*-глюкопира-
 ноза см. Целлобиоза
 6-О-(*α*-*D*-Глюкопиранозил)-*D*-глюкопи-
 раноза см. Изомальтоза
α-*D*-Глюкопиранозил-*α*-*D*-глюкопирано-
 зид см. Трегалоза
 4²-*α*-*D*-Глюкопиранозилмальтоза 49
α-*D*-Глюкопиранозилфосфат 67
 3-О-(*β*-*D*-Глюкопирануринозил)-2-амино-
 2-дезоксид-*D*-галактопираноза см.
 Хондрозин
 3-О-(*β*-*D*-Глюкопирануринозил)-2-амино-
 2-дезоксид-*D*-глюкопираноза см.
 Гиалобуриновая кислота
 4-О-*α*-*D*-Глюкопирануринозил-2-амино-2-
 дезоксиглюкопираноза 86
D-Глюкофураноза 14, 22
 Глюкоцеребозид 343
D-Глюкуроновая кислота 45, 66
 Гомогликаны 60
 Гонадотропный гормон 91
Гофмана реакция 79
Гриньяра—*Вюрца* метод 211
Гриньяра реакция 206, 207
 Групповые (группоспецифические) веще-
 ства крови 80, 85, 90, 93 сл.
 Группы крови 93, 94, 96 сл.
 Гуанозинфосфаты 414, 422
D-Гулоза 11

Даниэлла—*Дюсона* модель мембраны
 375 сл.
 Дегидратаза δ-аминолевулиновой кисло-
 ты 143
 Дегидрогеназа
 восстановленного НАД 403, 405
 β-оксимасляной кислоты 382
 Дегидропорфирин (Флорин) 103, 174
 Дегидроретиналь 181
 3-Дегидросфинганин (2-Амино-3-оксо-1-
 оксиоктадекан) 336
 2-Дезвинил-2-формилхлорофилл *a* 177
 3-Дезоксиальдоновая (метасахариновая)
 кислота 29
 6-Дезоксигалактоза см. Фукоза
 Дезоксигемоглобин 135
 6-Дезокси-*L*-манноза см. *L*-Рамноза
 2-Дезокси-β-*D*-рибоза 20
 Дезоксирибонуклеаза 397
 Дезоксисахара 10, 40
 Дейтерогемин IX 116
 Дейтеропорфирин 111, 122
 Дейтеропорфирин IX 102, 116, 121
 диметилловый эфир 107, 109
n-Декановая (каприновая) кислота 191
 Декстрасахарара 62
 Декстраны 62
 Декстрины 68
 Дерматансульфат (Хондротинсульфат
 В, β-Гепарин) 89
 Дефосфорилирование 419

- 1,2-О-Диалкилглицерины 249
 Диацетилдейтерогемин IX 116
 Диацетилдейтеропорфирин IX 102, 116, 119
 диметиловый эфир 107, 109
 1,2-Ди-О-ацил-3-О-(β-D-галактопиранозил)-*sn*-глицерин см. Галактозилдиглицерид
 1,2-Диацил-*sn*-глицерины 223, 224, 225, 230, 283
 реакции 286, 288
 синтез 246
 1,2-Диацил-*sn*-глицеро-3-О-бензилфосфиты 323
 1,2-Диацил-*sn*-глицеромонобензилфосфат 290
 1,2-Диацил-*sn*-глицеро-3-фосфат 224
 1'-(1,2-Диацил-*sn*-глицеро-3-фосфорил)-*sn*-глицерин 288
 1D-1-О-(1,2-Диацил-*sn*-глицерофосфорил)-миоинозиты 304
 1,2-Диацил-*sn*-глицеро-3-фосфорил-*L*-серины 285
 1,2-Диацил-*sn*-глицерофосфорилхолины см. Фосфатидилхолины
 1,2-Диацил-*sn*-глицеро-3-фосфорилэтанолламины 282
 1,2-Диацил-3-иод-3-дезоксид-*sn*-глицерины 279, 280, 283, 289
 1,2-Ди-О-ацил-3-О-(тетрагидропиранил-2)-*sn*-глицерин 247
 2-(N,N-Дибензиламино)-этилхлорфосфонат 322
 2,3-Дибензил-*sn*-глицерин 289
 1,6-Дибензил-2,5-метилен-*D*-маннит 239
 Дибензилфосфат, соль 277, 280
 α,α'-Дибромдипиррилметен 113, 114
 α,α'-Ди-(бромметил)-дипиррилметен 113
 Ди-трет-бутилфосфат, серебряная соль 280
 Дигалактозилдиглицериды 260, 356
 Дигидропорфин 102
 Дигидропорфирины 103
 Дигидросфингозин (*D*-эритро-2-Амино-1,3-диоксиоктадекан) 325
 Дигидроцереброзид, 3-О-сульфат 345
 Дигликозилдиглицериды 259
 α,β-Диглицерид-дифосфохолинтрансфераза 381
 Диглицериды 188, 224, 225, 233
 синтез 244 сл., 246
 Диглюкозилдиглицериды 260
 1,19-Дидезоксибилен 119
 α,α'-Дикарбоксидипирриметаны 117, 118
 4,4'-Диметил-3,3'-бис(β-карбетоксиэтил)дипиррилметан 119
 1,19-Диметил-1,19-дидезоксибиладиены-ас 121
 1,19-Диметил-1,19-дидезоксибилен-*b* 119
 α,α'-Диметилдипиррилметен 113
 β-(2,4-Диметил-5-карбетокси-3-пропионовая кислота, эфир 115
 Диметилпирролдикарбоновые кислоты, эфиры 114, 115
 Диметилпирролы 114, 115
 2,4-Диметил-5-формилпиррол 114, 115
 2,4-Диметил-3-формилпиррол-5-карбоновая кислота, эфир 115
 N,N-Диметилфосфатидилэтанолламин 285, 357
 2,4-Диметил-3-этил-5-(β,β-дициановинил)-пиррол 172
 2,4-Диметил-3-этил-5-карбетокси-пиррол 113
 Ди-*n*-нитробензилфосфат, серебряная соль 280
 Диоксиацетон 12
 Диоксиацетонфосфат 65, 68 сл., 353
 9,10-Диоксистеариновая кислота 194, 202
 2,3-Диоксокарбоновые кислоты 334
 Дипальмитоилстеароилглицерины 222
 Дипиррилкетоны 118, 122
 Дипиррилметан-5,5'-дикарбоновые кислоты 121
 Дипиррилметаны 117
 Дипиррилметены 113 сл.
 Дисахаразы 394
 Дисаиллактоза 59
 Дисаилоанглиозиды 344
 Дисперсия оптического вращения 37
 1,2-Дистеароил-*sn*-глицеро-3-фосфорил-*L*-серин 285
 2,3-Дистеароил-1-иод-1-дезоксиглицерин 234
 Дистрофия мышечная 62
 1,3-Дитритилглицерин 243, 244
 2,3-Дифтил-*sn*-глицеро-1-моно-*n*-нитробензилфосфат 289
 α,α'-Диформилдипиррилкетон 118
 Дифосфатидальацилглицерин (Ацилкардиолипин альдегидогенный) 299
 Дифосфатидилглицерины (Кардиолипины) 265, 293
 1,3-Дифосфоглицериновая кислота 65, 68 сл., 414, 416, 420
 1,4-Дихлорбутин-2 209
 DL-1,2,4,5-Ди-О-циклогексиденмиоинозит 314
 Дициклогексилкарбодимид 277
n-Додекановая (лауриновая) кислота 191, 206
 Докозатексаеновая кислота 181, 193
 Докозатриен-10,13-овая кислота 193
n-Докозановая (бегеновая) кислота 191
 Докозапентаен-4,7,10,13,16-овая кислота 193
 Докозатетраеновая кислота 181, 193, 208, 210
 Докозатриен-7,10,13-овая кислота 193
 Докозен-13-овая (эруковая) кислота 193, 214
 Дыхание 421
 Дыхательная цепь 402
 Дэкина—Веста реакция 336
 Еноил-АПБ-дегидратаза 349
 Еноил-КоА-гидратаза 352
 Енолфосфаты 414
 Железо-дигидропорфирин (Железо-хлорин) 151

Железо-формилпорфириин 151
 Желудочный сок 395
 Желчные кислоты 396
 Желчные пигменты 148
 Желчь 395
 Жирные альдегиды 366
 Жирные кислоты 191 сл., 199, 202 сл.
 биосинтез 197, 346 сл.
 бромпроизводные 195, 202
 выделение 195 сл.
 изомерия 200 сл.
 катаболизм 351 сл.
 кристаллизация низкотемпературная 195
 насыщенные 191 сл., 199, 205 сл.
 ненасыщенные 192 сл., 207 сл., 349
 полиморфизм 199, 204
 синтез 205 сл.
 спектры 204, 205
 удлинение углеродной цепи 349
 физические свойства 200
 Жирные спирты 215 сл.

Землена—Гельфериха реакция 50
 Зимогены 394
 Зрительные пигменты 181

D-Идит 306, 307
D-Идоза 11
L-Идуриновая кислота 45
 Изановая кислота 194
 Изокинальные заместители 20
L-Изолейцин 435
 Изолимонная кислота 399 сл., 403, 422
 Изомальтоза [6-О-(α -*D*-Глюкопиранозил)-*D*-глюкопираноза] 58
 Изопорфиропсин 181
 1,2-Изопропилиденглицерин 238, 239, 240, 250, 286
 2,3-Изопропилиденглицерин 234, 243, 250
 Изопропилиденглицерины 236 сл.
 2,3-Изопропилиден-*sn*-глицеро-1-бензилфосфат 289
 3,4-Изопропилиден-*D*-маннит 242
 Изопропилиденовая защита 236 сл.
 Изородопсин 181
 Изосахариновая (2-оксиметил-3-дезоксигальдоновая) кислота 29
 Изоферменты 438
 Изоцитратдегидрогеназа (Изоцитрат: НАД-оксидоредуктаза декарбоксилирующая) 400
 Изоцитрат-лиаза 401
 Иммуноглобулины 90
 Иммунодиффузия 75
 Инверсия формальная 222
 Ингибирование ферментативной активности 432, 434
 Индукция ферментов 437
 Инозит 300
 Инозитфосфатиды (Фосфоинозитиды) 189, 198, 300 сл.
 биосинтез 361
 оптически активные 314
 синтез 310 сл.

Инозитфосфатиды (фосфоинозитиды) сложные 309 сл.
 Инфаркт миокарда 87, 92, 371
 7-Иодгептановая кислота 211
 1-Иод-1-дезоксиг-2-ацетиленгликоль 258
 Иодопсин 181
Иоцича
 комплексы 208
 реакция 208

Кальциевый насос 430, 431
Кана—Инголда—Прелога номенклатура глицеринов 222
 Каприловая (*n*-октановая) кислота 191
 Каприновая (*n*-декановая) кислота 191
 Капроновая (*n*-гексановая) кислота 191
 3-(*N*-Карбобензоксисаланил)-2-бензил-3-иод-3-дезоксиг-*sn*-глицерин 292
 Карбобензоксильная группировка 241
N-Карбобензоксифинганин 330
 Карбоксидисмутаза 65
 Карбоксильной группы защита 278, 286
 Карбоксипептидаза 84, 394
 Карбонаты циклические 242
 Карбонильной группы реакции 23 сл.
 Карботрихлорэтоксигруппа 241
 ω -Карбоксиктилдентрифенилфосфоран 214
 Кардиолипид 292 сл., 295, 404
 биосинтез 359, 360
 Кардиолипины (Дифосфатидилглицерины) 265, 293
 Карнитин 398
 β -Каротин 427
 Каротиноиды 427
Карлса уравнение 34
 Катаболизм 391, 392, 429 сл.
 гемоглобина 148 сл.
 жирных кислот 351
 кефалин-плазмалогенов 364
 лецитина 358
 лецитин-плазмалогенов 364
 углеводов 67 сл.
 Каталаза 98
 Квантосома 427
 Квебрахит (1*D*-2-О-Метилмиоинозит) 314, 315
Кенигса—Кнорра реакция 50 сл., 320
 Кератосульфат 85, 90
 Кетальная защита 236
 β -Кетоацил-АЛБ-редуктаза 349
 β -Кетоацил-АЛБ-синтетаза 348
 3-Кетоацил-КоА-тиолаза 352
 Кетоглутарат—дегидрогеназа 400
 α -Кетоглутаровая кислота 399 сл., 422
 2-Кето-3,4-дидезоксиг-5-амино-*D*-глицеро-*D*-галакто-нооновая (нейраминовая) кислота 41
 Кетозы 10, 12
 4-Кетоктадекатриен-9,11,13-овая (ликановая) кислота 194
 «Кефалин» 188, 189
 Кефалин-плазмалогены см. Фосфатидальэтаноламины
 Кефалины см. Фосфатидилэтаноламины

- Кислотная реверсия 77
 α_1 -Кислый гликопротеин (Орозомукоид) 90, 91 сл.
 Кишечный сок 395, 397
 Клетка 406 сл., 418
 Кнорра реакция 114, 115
 Кольбе метод 213 сл.
 Конденсация нитроэтиольная 333
 Константа
 Михаэлиса 434
 спин-спинового взаимодействия 33
 Конформация моносахаридов 15 сл.
 Копропорфирин II, тетраметилловый эфир 108
 Копропорфирин III 102
 тетраметилловый эфир 107
 Копропорфориноген III 144
 Копропорфирины 101, 110, 111, 112
 Корд-факторы 262 сл.
 Кофермент Q (Убихинон) 403, 405
 Коферменты 434
 Крахмал 58, 61, 67, 394
 Креатин 416
 Креатинфосфат 416, 430
 Кребса цикл (Цикл трикарбоновых кислот, Цикл лимонной кислоты) 143, 399 сл., 404, 422, 434
 Крптопиррол 126, 170
 Крптопирролкарбоновая кислота 127
 Круговой дириозм 37
 D-Ксилит 307
 D-Ксилоза 11, 40, 43, 66
 Ксилулоза (D-трео-Пентулоза) 12
 D-Ксилулоза-5-фосфат 70
 Ксимениновая кислота 194
 Кули анемия (Талассемия, Средиземноморская анемия) 147
 Куна метод 81
 Кюстера формула порфина 128
- Лактатдегидрогеназа 70, 148, 155, 438
 Лакто-N-дифукогексаоза 57
 Лакто-2,3-дифукотетраоза 57
 Лактоза (4-О- β -D-Галактопнранозил-D-глюкопираноза) 48, 55—58
 1-О-Лактозил-4-сфинтенин 346
 Лактозилцерамид:галактозил-гидролаза 368
 Лактозилцерамидоз 368
 Лакто-N-тетраоза 48, 57, 81
 Лакто-N-фукопентаоза 57
 Лактулоза 55
 Лауриновая (н-додекановая) кислота 191, 206
 Лейкодистрофия 367
 «Лецитин» 188, 189
 Лецитин-плазмалогены см. Фосфатидальхолины
 Лецитинфосфонаты 321
 Лецитины см. Фосфатидилхолины
 Лигноцериновая (н-тетракозановая) кислота 191, 202, 342
 Лизолецитин-ацилгидролаза (Лизофосфолипаза, Фосфолипаза В) 271 сл.
 Лизофосфатидилхолин 264, 268
- Лизофосфолипиды 230
 Ликановая (4-кетоктадекатриен-9,11,13-овая) кислота 194
 D-Ликсоза 11, 20
 Лимит-декстриноз 62
 Линоевая (октадекадиен-9,12-овая) кислота 193, 202, 208—212
 Линоеловая (октадекатриен-9-12-15-овая) кислота 193, 201 сл.
 синтез 208—210
 эфир 204
 α -Линоеловая (октадекатриен-6,9,12-овая) кислота 193, 201
 γ -Линоеловая кислота 208, 210
 Линоелензландиновая кислота 202
 Липаза панкреатическая (Гидролаза эфиров глицерина) 228, 247, 271, 354, 364, 396
 Липемия 87
 Липидозы 367
 Липиды 185 сл., 219 сл., 396
 алкильные 215, 249 сл., 362 сл.
 альдегидогенные 363 сл.
 бактериальные 192, 198
 биологическая роль 380 сл.
 диольные 257 сл.
 классификация 185 сл.
 нейтральные 186, 187, 198, 225 сл., 249 сл.
 — биосинтез 352 сл., 362 сл.
 — катаболизм 364
 номенклатура 221 сл.
 с простой эфирной связью 362 сл.
 состав 197 сл., 218
 стереохимия 219 сл.
 Липоамид-дегидрогеназа 400
 Липоаминокислоты см. Фосфатидилглицерин, О-аминокислотные эфиры
 Липоат—ацетилтрансфераза (Ацетил-КоА:дегидролипид-S-ацетилтрансфераза) 399
 Липонилредуктаза 399 сл.
 Липопротениды
 биологическая роль 368 сл.
 высокой плотности (α -Липопротениды) 370 сл., 372
 ламеллярные 369
 низкой плотности (β -Липопротениды) 370, 372, 382
 очень низкой плотности (Пре- β -липиды) 370, 382
 плазмы 369 сл., 371 сл.
 Липопротенины 91, 155
 Литотрофный (неорганотрофный, хемосинтетический) обмен 407
 Литохоловая кислота 396
 Лобри де Брюина—Альберда ван Экенштейна реакция 29, 40 сл., 55, 78
 Ломана реакция 416
 Луси модель мембраны 377
 Льюиса системы групп крови 94, 96 сл.
 Люмиродопсин 182
- Магнийвинилфеопорфирин a_5 (Протохлорофиллид а) 179, 180

Магнийгексадегидрофеопорфирин α_5 ,
эфир 177
Магнийпорфирины 104
Магнийпротопорфирины 179
Магнийтетрагидрофеопорфирин α_5 177
Майяра реакция 77
Мак-Дональда метод 118
Мак-Лафферти перегрузшровка 205
Макроцитарная анемия 148
L-Малат—гидро-лиаза (Фумарат-гидра-
таза, Фумараза) 401
Малатдегидрогеназа (L-Малат:НАД—
оксидоредуктаза) 401
Малат-синтаза 401
Малонил-S-КоА 347
Малонилтрансацилаза 348
Мальтоза (4-O- α -D-Глюкопиранозил-D-
глюкопираноза) 47—49, 58
4-O- α -Мальтозил-D-глюкоза 49
6-O- β -Мальтозил- β -D-глюкопираноза, ун-
декаацетат 52
Мальтотриоза 48, 49
D-Манноза 11, 39, 40, 42
D-Маннозамин 44
Маннозилфосфатидилмиоинозиты 309
D-Маннозо-6-фосфат 66
 β -D-Маннофураноза 38
Масляная (н-бутановая) кислота 191
Матрикс 398
Мезобилин (Уробилин) 149
Мезобилиноген 148
Мезобилирубин 148
Мезогем IX 151, 158
Мезопорфирин IX 102, 126, 142, 158
диметиловый эфир 107, 108, 109,
123 сл.
синтез 118, 121, 122
Мезопорфирины 102, 111, 121
Мезохлорин 165
Мелибиоза (6-O- α -D-галактопиранозил-
D-глюкоза), октаацетат 51
Мелиссавая (триаконтановая) кислота
191
Мембрана(ы) 373 сл., 377 сл., 432
митохондрий 346, 374, 381 сл., 398,
425, 433, 439
модели 375 сл.
молекулярная организация 375 сл.
плазматические 374, 380
проницаемость 439
сопрягающие 398, 408, 432
транспорт ионов и молекул 380, 430
сл., 439
фоторецепторная 180
фрагментация 377 сл.
хлоропластов 427
элементарная 375
эндоплазматическая 397
Мембранный потенциал 409, 430
Метаболизм 393, 432 сл.
Металлопорфирины 104
Метародопсин 182
Метасахариновая (3-дезоксальдоновая)
кислота 29
Метгемоглобин 156

2-Метилальдоиновая (сахариновая) кис-
лота 29
3-Метил-4-аминоэтилпиррол 173
N-Метиламиноэтилфосфонилцерамид 339
Метил-D-галактопиранозид 30, 39
Метил-D-галактофуранозид 39
Метил- α -D-глюкопиранозид 22, 30
 α -Метилдипиррилметен 113
3-Метил-4-карбметоксизтилпиррол-2-аль-
дегид 173
3-Метил-4-карбэтоксипиррол 172
Метил- β -D-ксилопиранозид 20
 β -Метиллецитины 265
1D-2-O-Метилмиоинозит см. Квебрахит
Метилмиоинозиты 301, 302
Метил-D-маннопиранозид 30
N-Метилникотинамид 414
10-Метилдектадекановая (туберкулостеа-
риновая) кислота 192, 202, 204
2-O-Метил-D-рамноза 263
Метил-(5,9,13-триметилтетрадецил)-ма-
леинимид 153
Метилфеофорбид α 176
N-Метилфосфатидилэтаноламин 357
5-Метил(этил)-дипиррилметен 121
Метилэтилмалеинимид 128, 142, 153
3-Метил-4-этил-5-оксиметил-2-карбокси-
пиррол 113
Меркаптал (тиоацетал) сахаров 24
Меркаптоуксусная кислота 228
Метионин активный 414
Метод(ы)
активированных фосфатов 274
Бэрри 83
гликальный 55 сл.
с использованием ангидросахаров 52
Кольбе 213 сл.
Куна 81
Мак-Дональда 118
метилирования 80 сл.
ортоэфирный 51 сл.
оксазолиновый 53
Пурди—Ирвинга 81
Роземунда 113
серебряных солей 274
Смита 83
удлинения углеродной цепи 206,
208 сл., 213
Фишера 243
Хеурса 81
«холодный» 117 сл.
4-Метоксисфинганин 333
1-O-(2-Метоксисалкил)-глицерины 249
Механохимическая гипотеза энергетиче-
ского сопряжения 409, 425
Миелин 374
Микозиды 263
Миколовые кислоты 192, 262, 263
Микодерозиновая кислота 264
Микрозиды 262
Микротельца 398
Микроцитарная анемия 147
Милла формулы углеводов 22 сл.
Миоглобин 126, 133, 139 сл., 157
Миозин 430
Миоинозит 216, 300, 302, 306

Миоинозитдифосфаты 304—306
 Миоинозитмонофосфаты 304, 314—316
 Миоинозитполифосфаты (Полифосфоинозитиды) 304 сл.
 Миоинозиттрифосфаты 305—308
 Миоинозитфосфаты 303, 306
 Миоинозит-1-фосфоглицерин 304
 Миоинозиты 310, 315
 Миристиновая (*n*-тетрадекановая) кислота 191
 Митохондрии, ферментные системы 398
Михаэлиса константа 434
 Молочная кислота 69, 419, 421, 422
 Моноглицозидглицериды 259, 354
 Моноглицериды 225, 233, 243 сл.
 N-Монометилфосфатидилэтаноламин 285
 Моносахариды 10, 12 сл., 21
 ациклические формы 15
 биосинтез 65
 дисперсия оптического вращения 37
 защита OH-групп 50
 комплексы 35, 38, 39
 конформация 15 сл., 17
 номенклатура 21 сл.
 оптическое вращение 30
 производные 24, 25 сл.
 реакции 23 сл., 26 сл.
 рентгеноструктурный анализ 38
 спектры 31 сл.
 таутомерия 14
 фосфорилирование 419
 хроматография 38
 циклические формы 13 сл.
 электрофорез 39 сл.
 Моносиалоганглиозиды 344, 367
 Монофосфоинозитиды 302 сл.
 Мукоинозит 300
 Мукоитинсерная кислота 90
 Муколипиды 73
 Мукополисахариды 72, 73
 Мукопротеины 9, 72, 73
 Мутаротация 15
 Муцины 91

Натриевый насос 380, 431
 Натрийацетоуксусный эфир 335
 Нейраминидазы 76, 92, 97, 367
 Нейраминовая (2-кето-3,4-дидезокси-5-амино-*D*-глицеро-*D*-галакто-нононовая) кислота 41
 Неоинозит 300
 Неоганотрофий (хемосинтетический, литотрофный) обмен 407
 Нервон 342
 Нервоновая (тетракозеи-15-овая) кислота 193, 342
 Низиновая (тетракозагексаен-4,8,12,15,18,21-овая) кислота 193
 Никотиинамидадениндинуклеотид (НАД) 405, 406, 408, 414, 417
Ниманна—*Пика* болезнь 367
n-Нитробензилфосфат, соль 277
n-Нитробензил-2-хлорэтилфосфат, серебряная соль 281
 2-Нитро-1,3-диола 333

Нуклеиновые кислоты 397
 Нуклеозиддифосфаткиназа 400, 416
 Нуклеозиддифосфаты сахаров 66
 Нуклеозидтрифосфаты сахаров 66

 Обмен веществ 391 сл.
 Овальбумин 84
Оверхаузера эффект 34
 Окисление
 анодное 207
 периодатное 82 сл.
 сопряженное 406
 Окислительный пентозофосфатный цикл 68, 70
 Оксазолидины 330
 О-Оксалил-2,3,4,5,6-пента-О-ацетилмиоинозиты 316
 3-Оксиацил-КоА-дегидрогеназа 352
 2-Оксигексакозановая кислота 194
 Оксигемоглобин 132, 135
 2-Оксидокзановая кислота 194
 Оксидоредуктазы 402 сл., 404 сл., 433
 2-Оксиметил-3-дезоксинальдоновая (изосахариновая) кислота 20
 Оксимы сахаров 24
 Оксинервон 342
 Оксинервоновая (2-окситетракозеи-9-овая) кислота 194, 342
 9-Оксиоктадецен-12-овая кислота 194
 12-Оксиоктадецен-9-овая (рицинолевая) кислота 194, 202
мезо-Окситпорфирин 118
β-Окситпорфирин 124
 4-Оксисфинганин 331, 337, 339
 4-Оксисфингенин 337, 365
 4-Окси-8-офингенин 329
 2-Окситетракозановая (цереброиновая) кислота 194, 342
 2-Окситетракозеи-9-овая (оксинервоновая) кислота 194, 342
 18-Оксилеостеариновая кислота 194
 Оксобиланы-*a* 122 сл.
 Оксобиланы-*b* 124
 Оксоглутаратдегидрогеназа 400
 Оксородопорфирин 106
 Окта-О-ацетилсахароза 52
 Октадекадиен-6,9-овая кислота 193
 Октадекадиен-9,12-овая (линолевая) кислота 193, 202, 208—212
n-Октадекановая (стеариновая) кислота 191, 193, 202
 Октадекатетраен-6,9,12,15-овая кислота 193
 Октадекатриен-6,9,12-овая (*α*-линоленовая) кислота 193, 201
 Октадекатриен-9,11,13-овая кислота 213
 Октадекатриен-9,12,15-овая (линоленовая) кислота 193, 201 сл., 204, 208—210
 1-О-(Октадецен-9-ил)-глицерин (Селахиловый спирт) 249
 Октадецен-9-овая (олеиновая) кислота 193, 201 сл., 214, 350

1-О-Октадецилглицерин (Батилловый спирт) 249
 n-Октакозановая кислота 191
 n-Октановая (жаприловая) кислота 191
 Олеиновая (октадецен-9-овая) кислота 193, 201 сл., 214, 350
 Олигосахариды 10, 47 сл.
 биосинтез 56, 66
 метилирование 80 сл.
 модификация 55 сл.
 молока 57
 серологически активные 95
 синтез 49, 50 сл.
 Опсин 181, 182
 Опсопиррол 126
 Опсопирролкарбоновая кислота 127
 Органотрофный обмен 407, 408
 Орозомукоид (α_1 -Кислый гликопротеин) 90, 91 сл.
 Ортоэфиры сахаров 51 сл.
 Оствальда правило 231

Пальмитиновая (n-гексадекановая) кислота 191, 349
 Пальмитиновый альдегид 366
 Пальмитолеиновая кислота 350
 Панкреатический сок 395
 Папаин 76, 88, 89
 Пастера эффект 70
 Пектиновые вещества 63
 Пеларгоновый альдегид 214
 Пемптопорфирин 102, 121, 125
 DL-1,2,4,5,6-Пента-О-ацетилмиоинозит 312, 316
 2,3,4,5,6-Пента-О-ацетилмиоинозиты 318
 1D-2,3,4,5,6-Пента-О-бензилмиоинозит 316
 DL-2,3,4,5,6-Пента-О-бензилмиоинозит, фосфат 312
 1,2,4,5,6-Пента-О-бензилмиоинозиты 311, 314
 Пентапиранозы 20
 Пентозофосфатный (фосфоглюконатный, гексозомонофосфатный) путь (Пентозный цикл) 68, 426
 D-эритро-Пентозулоза 22
 D-трео-Пентулоза (Ксилулоза) 12
 D-эритро-Пентулоза (Рибулоза) 12, 22
 Пепсин 84, 394
 Перегруженность
 Амадори 77
 Мак-Лафферти 205
 Peroксидаза 98
 Петрозелиновая кислота 201
 Пигмент P_{700} 427
 Пиранозы 17, 22
 Пиридиндинуклеотиды 417
 Пиридин-ферромохром 151
 Пиримидины 401
 Пировиноградная кислота 69, 399 сл., 421, 424
 Пирофеофорбид α 168, 169, 171
 Пирофосфаты 414
 Пирофосфорилирование 415
 Пирролкарбоновые кислоты 126 сл.
 Пирролы 112 сл., 126

Пирропорфирины 102, 121, 172
 Пирроэтиопорфирин 172
 Пируватдекарбоксилаза 70, 399
 Пируваткиназа 70
 Пищеварение 391 сл., 393 сл.
 Пищеварительные соки 394, 395
 Плазма крови 91 сл., 93, 369, 370 сл.
 Плазмали 251
 Плазмалогены 190, 215
 нейтральные 187, 188, 251 сл.
 — катаболизм 364
 — синтез 247, 253
 фосфорсодержащие 294 сл.
 Пластохинон 427
 Пластоцианин 427
 Полиглицерофосфатиды 287 сл., 359
 1,4-Полиинновые соединения 208
 Полиморфизм
 глицеридов 231 сл.
 жирных кислот 199
 фосфолипидов 266
 Полиолы 216 сл.
 Полисахарид-белковые комплексы 73, 85 сл.
 Полисахариды 10, 56 сл., 59 сл., 66, 80
 Полиурониды 63
 Полиферментные системы 433 сл.
 Полифосфоинозитиды (Миоинозитполифосфаты) 304 сл.
 Полоса поглощения Соре 105
 Порфины 101, 108, 112 сл., 128
 Порфирин a 152 сл.
 Порфирин c 158
 Порфиринкарбоновые кислоты 111, 112
 Порфириногены 102
 Порфиринурия 145
 Порфирины 101 сл., 103 сл.
 биосинтез 142 сл., 401
 изомерия 101 сл., 112
 метилловые эфиры 103, 111
 разделение смесей 111 сл.
 спектры 105 сл., 107, 110
 Порфирия 145
 Порфиросин 181
 Порфобилиноген 143
 Порфодиметен 103
 Порфометен 103
 Потенциал
 стандартный восстановительный 423
 трансмембранный 425
 Правило (а)
 изоротации (правила Хадсона) 30 сл.
 конверсии 223
 Оствальда 231
 Пре- β -липопротеиды (Липопротеиды очень низкой плотности) 370, 382
 Прелюмиродопсин (Батородопсин) 182
 Принцип оптической суперпозиции Вант-Гоффа 30
 Промежуточный обмен 397 сл.
 Проназа 76, 84, 93
 Пропаргилбромид 209, 210
 Пропердин 92
 Протамин 437
 Протеолипиды 369, 379 сл.
 Прототем IX 151, 155

Протогемин IX 114, 116
 Протонный насос 432
 Протопорфирин 102, 142 сл.
 Протопорфирин III 118
 Протопорфирин IX 102, 126, 128, 179
 биосинтез 143 сл.
 синтез 116, 120, 125
 солянокислое число 111
 эфиры 107, 108, 109
 Протохлорофилл *a* 180
 Протохлорофиллид *a* (Магнийвинилфео-
 порфирин *a_s*) 179, 180
 Протромбин 90
 Псевдоротация 20
D-Психоза 12
 Психозин (4-Сфингенилгалактозид) 342,
 346
Пурди—Ирвинга метод 81
 Пурины 401
 Пурпурин 174 сл.

Рак 92
L-Рамноза (6-Дезокси-*L*-манноза) 40, 43
 Распад

 ретроальдольный 29
 по Руффу 56
 по Эмбдену—Мейергофу—Парнасу
 68, 70 сл.

Раффиноза [α -*D*-Галактопиранозил-
 (1 $\rightarrow$ 6)- α -*D*-глюкопиранозил- β -
D-фруктофуранозид] 48, 58

Реакция (и)

 Аридта—Эйстерта 206
 Бредерека 50
 Виттига 214
 Гофмана 79
 Гриньяра 206, 207
 Дэкина—Веста 336
 Земплена—Гельфериха 50
 Июича 208
 Кенигса—Кнорра 50 сл., 320
 Кнорра 114, 115
 Лобри де Брюина—Альберда ван
 Экенштейна 29, 40 сл., 55, 78
 Ломана 416
 Майяра 77

 перефосфатилирования 289
 теломеризации 207
 темновая фотосинтеза 427
 транскетолазная 70

 Уоррена 46
 фазовой пробы 168
 Фишера—Цервека 114
 Фриделя—Крафтса 116
 Эрлика 46
 Яппа—Клингемана 334, 335

Ревматизм 88, 92

• Регуляция метаболизма 432 сл.
 аллостерическая 436

Редуктиновая кислота 41

Резорбция 391, 394, 396

Резус-фактор (Антиген Rh) 94

Реннин 394

Рентгеноструктурный анализ моносахаридов 38

Репрессия 437

Ретиналь 180 сл.

N-Ретинилиденопсин 182

Ретинилиденпротеиды 180 сл.

D-Рибоза 11, 39

Рибозо-5-фосфат 70

Рибонуклеаза 91, 397

Рибосомы 398

Рибофлавин-5-фосфат 155

Рибулоза (*D*-эритро-Пентулоза) 12, 22

D-Рибулозо-1,5-дифосфат 65

D-Рибулозо-5-фосфат 70, 426

Рицинолевая (12-оксоктадецено-9-овая)
 кислота 194, 202

Родины 177

Родопорфирины 102, 106, 121, 171, 172

Родопсин 181, 182

Родохлорин 170

Роземунда метод 113

Руффа деградация 56

Сарколемма 430

Сахариновая (2-метилальдоновая) кис-
 лота 29

Сахарные кислоты 21

Сахароза (β -*D*-Фруктофуранозил- α -*D*-
 глюкопиранозид) 58, 66

Сахарозо-УДФ-глюкозилтрансфераза 66

Сахарозофосфат-УДФ-глюкозилтрансфе-
 раза 66

Свободная энергия 410 сл., 423

 стандартная 411 сл.

D-Седогептулозо-7-фосфат 70

Секвойтол 217

Селахилловый спирт [1-О-(октадецено-9-
 ил)-глицерин] 249

Септанозы 15, 22

Серповидноклеточная анемия 146

Сиаловые кислоты 10, 41 сл., 76

Сиаломуцины 91, 97

Синтетаза

δ -аминолевулиновой кислоты 143

 высших жирных кислот 348

 дрожжевая 433

Слюна 395

Смита метод 83

Соединительная ткань 86, 87, 89

Солянокислое число порфиринов 111

D-Сорбоза 12

Соре полоса поглощения 105

Средиземноморская анемия (Анемия Ку-
 ли, Талассемия) 147

Стеариновая (*n*-октадекановая) кислота
 191, 199, 202

1-Стеарил-2,3-изопропилиденглицерин
 234

1-Стеарил-2,3-эпоксиглицерин 234

Стеркобилиноген 148

Стереоизомерия моносахаридов 13, 15

Сукцинатдегидрогеназа 401, 403, 404,
 405, 434, 435

Сукцинат:КоА-лигаза (ГДФ) (Сукцинил-
 КоА-синтетаза, Сукцинаттиокси-
 наза) 400

Сукцинил-КоА 399 сл., 422

- Сукцинил-КоА—гидролаза 400
 Сульфатиды 343, 367
 Сульфогликозилдиглицериды 261
 Сульфогликолипиды 219
 Сфингадиены 326, 339
 Сфингилфосфорилхолин 366
 Сфинганин 326, 330, 333
 биосинтез 365
 синтез 334, 336 сл.
 4-Сфингилгалактозид (Психозин) 342, 346
 4-Сфингенин 326, 330 сл., 332, 335
 биосинтез 365
 Сфингозин (*D*-эритро-2-Амино-1,3-диокси-*транс*-октадецен-4) 324 сл.
 Сфингозиновые основания 324 сл., 327, 329 сл.
 антиподы 337
 N-ацилированные 340
 биосинтез 364 сл.
 катаболизм 366
 номенклатура 326
 окисление 328, 331, 332
 производные 329, 337
 синтез 333 сл.
 Сфинголипидные основания 219
 Сфинголипиды 186, 324 сл.
 биосинтез 364 сл.
 выделение 327 сл.
 катаболизм 364 сл.
 природные 338 сл.
 реакции 329 сл.
 фосфорсодержащие 338 сл.
 Сфингомиелиназа 366
 Сфингомиелины (Церамидфосфорилхолины) 198, 338 сл., 341, 366
 Сфингофосфолипиды 341
 Сфингоэтаноламин 339, 341
 Сциллоинозит 300
 Сциллоинозола 217
 Сыворотка крови 90
- D*-Тагатола 12
 Тактоиды 146
 Талассемия (Анемия средиземноморская, Анемия Кули) 147
D-Талоза 11
D-Талозамин 45
 Тауредоксиколовая кислота 396
 Таурохолевая кислота 396
 Таутомерия моносахаридов 14
 Твердофазный синтез олигосахаридов 53 сл.
 Тейхоевые кислоты 85
 Темновая реакция фотосинтеза 427
 Тетра-О-ацетил- α -*D*-галактопиранозилбромид 51, 345
 1,2,3,4-Тетра-О-ацетил-*D*-глюкоза 51, 52
 1,2,3,4-Тетра-О-ацетил- α -*D*-глюкопираноза 50
 Тетра-О-ацетил- α -*D*-глюкопиранозилбромид 50
DL-3,4,5,6-Тетра-О-ацетилмиоинозит 311
DL-1,4,5,6-Тетра-О-бензилмиоинозит 311, 312, 315
- 3-О-Тетрагидропиранил-*sn*-глицерин 246
 Тетрагидропиранильная защита 238
 Тетрагидропорфин 102
n-Тетрадекановая (миристиновая) кислота 191
 Тетракозагексаен-4,8,12,15,18,21-овая (низиновая) кислота 193
n-Тетракозановая (лигноцериновая) кислота 191, 202, 342
 Тетракозатетраен-9,12,15,18-овая кислота 193, 210
 Тетракозен-15-овая (нервоновая) кислота 193, 342
 2,3,4,6-Тетра-О-метилгалактоза 260
 2,3,4,5-Тетра-О-метил-*D*-глюкоза 15
 2,3,4,5-Тетра-О-метил- β -*D*-глюкосептано-за 15
 (3,5,4',5'-Тетраметилдипиррил-2,2')-метен 115
 2,8,12,18-Тетраметил-3-карбэтоксипорфин 110
 Тетрапиррольные соединения 119
D-Треулоза 12
 Тиамин 414, 417
 Тилакоиды 426
 Тиоацетали (меркапталы) сахаров 24
 Тиобарбитуровая кислота 46
 Тиофоразы 351
 Тиреотропин 91
 3-О-(2-Тозилоксиалкил)-*sn*-глицерины 297
 Толленса формулы моносахаридов 22 сл.
 Трансальдолаза 70
 Трансгликозилазы 56, 66
 Транскетоллаза 70
 Трансукциниллаза 400
 Трансферрин 91
 Трегалола (α -*D*-Глюкопиранозил- α -*D*-глюкопиранозид) 47, 48, 58
 6,6'-димиколат 263
D-Треит 15 сл., 305
D-Треоза 11
L-Треонин 435
 Триахонтановая (мелиссовая) кислота 191
 3,4,6-Три-О-ацетил-1,2-ангидроглюкоза (Ангидрид Бригля) 52
 Тригексозилцерамид 367
 Триглицериды 198, 221, 225, 228
 биосинтез 352
 гидролиз ферментативный 354
 перезэтерификация 248
 разделение 188
 резорбция 397
 синтез 247 сл.
 2,4,6-Триэпропилбензолсульфохлорид 277
 4,3',5'-Триметил-3,4'-диацетил-5-формилдипиррилметан 119
 3,13,19-Триметилтрикозановая кислота 192
 Трипиррен 121
 Трипсин 97, 436, 438
 Трипсиноген 438
 Трисialogанглиозиды 344

Тритил-*sn*-глицерины 240, 246 сл., 251
 Тритильная защита 240 сл.
 2-О-Трихлорацетил-3,4,6-три-О-ацетил-
 глюкоза 52
 3-β,β,β-Трихлорэтилкарбонат *sn*-глице-
 рина 241
 Туберкулостеариновая (10-метилоктаде-
 кановая) кислота 192, 202, 204
 Турадин (Уропорфрина III медный
 комплекс) 104
 Убихинон (Кофермент Q) 403, 405
 Углевод-белковые комплексы 9 сл., 72,
 74 сл.
 Углеводы 10 сл., 218
 УДФ-*D*-Глюкозодегидрогеназа 66
 УДФ-*D*-Глюкозо-4-эпимераза 66
 Укорочение углеродной цепи сахаров 56
 Уоррена реакция 46
 Уравнение Карпласа 34
 Уробилин 148
 Уроновые кислоты 10, 41
 Уропорфрин I 143
 Уропорфрин II 108, 118
 Уропорфрин III 102, 143 сл.
 медный комплекс (Турадин) 104
 Уропорфриногены 143, 144
 Уропорфрины 101, 111 сл., 118
 Фарнезол 178
 Фенилдихлорфосфат 275
 Феопорфрин *a*₅ 170, 171
 Феопурпурин 7, триметиловый эфир 170
 Феопурпурин 18 168, 170
 Феофитин *a* 168, 169, 171, 176
 Феофорбид *a* 168, 169
 Фермент(ы)
 активность 432, 434
 ветвящие 67
 ингибирование 434
 индукция 437 сл.
 Кори 67
 многоглавые 155
 пищеварительных соков 394, 395
 протеолитические 76
 регуляторные 436
 репрессия 437
 Q 67
 R 68
 Ферредоксин 427
 Ферредоксин-НАДФ⁺-оксидоредуктаза
 427
 Феррицитохром *c* 163 сл.
 Феррохелатаза (Гем-синтетаза) 145
 Фетун 74, 92
 Фибриллы 430
 Фибриноген 90, 91
 Фикобилины 427
 Филлины 104
 Филлопиррол 126, 170
 Филлопирролкарбоновая кислота 127
 Филлопорфрин 102, 106, 121, 172
 Филлоэритрин 171
 Фитин 217
 Фитогликолипид 310

Фитол 167, 168
 Фитосфингозин (Церебрин) 325. См. так-
 же 4-Оксисфинганин
 Фишера
 метод 243
 формулы порфина 101
 — проекционные сахаров 21
 Фишера—Цервека реакция 114
 Флавопротейды 403, 406
 Флорин (Дегидропорфрин) 103, 174
 Фолиевая кислота 148
 Форбиды *b* 177
 Формазаны сахаров 24
 2-Формилдейтеропорфрин III 107
 2-Формилпирролы 121
 5-Формил-2-фуранкарбоновая кислота 41
 Фосфатаза 65
 Фосфатидалевые кислоты 265, 295
 Фосфатидальглицерины 265
 Фосфатидаль-N,N-диметилэтаноламин
 298
 Фосфатидальинозит 295
 Фосфатидальсерины 265, 295
 Фосфатидальхолины (Лецитин-плазмало-
 гены) 265, 296, 364
 Фосфатидальэтаноламины (Кефалин-
 плазмалогены) 190, 265, 298, 364
 Фосфатид-ацилгидролазы см. Фосфоли-
 плазы
 Фосфатидиламинокислоты 322
 Фосфатидилглицерины 265, 287 сл., 319,
 359
 О-аминокислотные эфиры (Липоами-
 нокислоты) 219, 265, 290 сл., 360
 Фосфатидилглицерофосфаты 265, 290,
 359
 1-Фосфатидилглюкоза 321
 1*D*-1-О-Фосфатидил-2,6-ди-О-(α-*D*-ман-
 нопиранозил)-миоинозит 310
 Фосфатидил-N,N-диметилэтаноламины
 265
 3-*sn*-Фосфатидил-1'-[3'-О-*L*-лизил-(ала-
 нил)]-*sn*-глицерины 291
 Фосфатидилманнопиранозилмиоинозит
 (Фосфатидилмиоинозитманнозид)
 309, 310, 362
 Фосфатидилмиоинозит 313, 361, 362
 1*D*-1-О-Фосфатидилмиоинозит-4,5-дифос-
 фаты 309
 1*D*-1-О-Фосфатидилмиоинозит-4-фосфат
 309
 Фосфатидилпептиды 322
 Фосфатидилсериндекарбоксилаза 357
 Фосфатидилсерины 265, 285 сл., 357, 358
 Фосфатидилтреонины 265, 285
 Фосфатидилхолин-холинфосфогидролаза
 см. Фосфолипаза C
 Фосфатидилхолины (Лецитины, 1,2-Ди-
 ацил-*sn*-глицерофосфорилхолины)
 198, 265, 280 сл., 282, 356
 биосинтез 356, 366
 катаболизм 358
 Фосфатидилэтаноламины (Кефалины)
 189, 190, 265, 282 сл., 285
 бензиловый эфир 320
 биосинтез 356, 366

Фосфатидилэтаноламины (Кефалины) жирнокислотный состав 198
 катаболизм 398
 Фосфатидовые кислоты 223, 228, 230, 265; 283 сл.
 биосинтез 353
 синтез 279 сл.
 Фосфаты активированные 274
 N-Фосфогаргинин 414
 Фосфогены (Амидинфосфаты) 414, 416
 2-Фосфоглицерат 421
 Фосфоглицераткиназа 68
 Фосфоглицериды 225
 3-Фосфоглицериновая кислота 65, 68 сл., 420
 3-Фосфоглицериновый альдегид 65, 68 сл., 70
 Фосфоглюкоизомераза 68
 Фосфоглюкомутаза 65, 68
 6-Фосфоглюконат 426
 Фосфоглюконатный (пентозофосфатный, гексозомонофосфатный) путь (Пентозный цикл) 68, 426
 6-Фосфо-*D*-глюконовая кислота 70
 6-Фосфо-*D*-глюконолактон 70
 Фосфоенолпириновградная кислота 69, 414, 421
 Фосфоинозитидинозитфосфогидролаза 362
 Фосфоинозитиды см. Инозитфосфатиды
 N-Фосфокреатин 414
 Фосфолипаза A_1 (Фосфатид-ацилгидролаза) 271
 Фосфолипаза A_2 228, 271, 288
 Фосфолипаза В (Лизофосфолипаза, Лн-золецитин-ацилгидролаза) 271 сл.
 Фосфолипаза С (Фосфатидилхолин-холинфосфогидролаза) 272, 288
 Фосфолипаза D 272, 289
 Фосфолипазы (Фосфатид-ацилгидролазы) 271, 358, 364, 396
 Фосфолипиды 186, 249, 264 сл., 396
 биологическая роль 360 сл.
 биосинтез 356 сл.
 взаимопревращения 357
 катаболизм 356 сл.
 производные 322
 синтез 273 сл.
 состав 198, 219
 структура 270
 фракционирование 188 сл.
 химические свойства 269
 Фосфонилирование 321
 Фосфонокефалин 361
 Фосфонолипиды 321 сл., 361
 4-Фосфопантотениновая кислота 348
 Фосфопентозэпимераза 70
 Фосфопируват-гидратаза 70
 Фосфорибозилпирофосфат 415
 Фосфориллазы 67, 436
 Фосфорилирование 274 сл., 408
 окислительное 406, 421 сл., 425
 субстратное 401, 419 сл., 422
 фотосинтетическое (фотофосфорилирование) 426 сл.
 Фосфорилирующие агенты 275 сл., 284

Фосфорилхолин 356
 Фосфорилэтаноламин 356, 366
 Фосфористая кислота, смешанные ангидриды 276
 Фосфорная кислота, ангидриды 276
 Фосфосеринфосфатазы 359
 Фосфотрансфераза 366
 Фосфофруктокиназа 68
 Фосфоэтаноламин, соль 299
 Фотоллиз родопсина 182
 Фотосинтез 426 сл.
 Фотосистемы 427
 Фототрофный обмен 407, 426
 Фотофосфорилирование (Фосфориллирование фотосинтетическое) 426 сл.
 Фрей-Виссинга и Мюлеталера модель мембраны 376 сл.
 Френозин 342
 Фриделя—Крафтса реакция 116
D-Фруктоза 12
D-Фруктозо-1,6-дифосфат 65, 68, 419
D-Фруктозо-6-фосфат 65, 68, 70, 419
 β -Фруктофуранозиды 396
 β -*D*-Фруктофуранозил- α -*D*-глюкопиранозид см. Сахароза
 2-Фталимидэтилхлорфосфонат 321
 Фукоза (6-Дезоксигалактоза) 40, 43
 Фукозидолактоза 57
 Фумараза (*L*-Малат—гидро-лиаза, Фумарат-гидратаза) 401
 Фумаровая кислота 399, 401
 Фуранозы 17, 22

 Хадсона правило 30 сл.
 Хаульмугровая [13-(циклопентен-2-ил)-тридекановая] кислота 195, 202
 Хемосмотическая гипотеза энергетического сопряжения 409, 425
 Хемосинтетический (неорганотрофный, литотрофный) обмен 407
 Хенодезоксихолевая кислота 396
 Хеуорса
 метод метилирования 81
 формулы сахаров 22 сл.
 Хиломикроны 252, 354, 370 сл., 372
 Химильовый спирт (1-О-Гексадецилглицерин) 249
 Химическая гипотеза энергетического сопряжения 409, 425
 Химическая термодинамика 409 сл.
 Химический сдвиг 33
 Химотрипсин 394, 438
 Химотрипсиноген 438
 Хироинозит 300
 Хитин 64
 Хитобиоза [4-О-(2-Амино-2-дезоксид- β -*D*-глюкопиранозил)-2-амино-2-дезоксид-*D*-глюкопираноза] 48, 58
 1-О-(1-Хлоралкил)-*sn*-глицерин, циклокарбонат 254
 4-Хлорбутин-2-ол-1 209
 Хлорин 102
 Хлорин 5 175
 Хлорин a_2 165
 Хлорин e_6 168, 169, 172

Хлоробнум-феофорбиды 178
 Хлоробиум-хлорофилл 165, 177 сл.
 Хлорокруоропорфирин 102, 111, 125
 Хлороласты 167, 376, 427, 428
 Хлоропорфирины 172
 Хлорофилл(ы) 104, 165 сл., 177, 427, 428
 алломеризованный 170
 биосинтез 145, 179 сл.
 Хлорофилл *a* 166, 167 сл., 172 сл., 179 сл.
 Хлорофиллаза 168
 Хлорофиллиды 168, 169, 171
 1-Хлорундекадин-2,5 211
 β-Хлорэтилфосфорилдихлорид 341
 Холестерин
 резорбция 396
 эфиры 258, 354, 396
 Холестерол-эстераза 354
 Холин 356, 414, 417
 Холинкиназа 356
 Холинфосфат-цитидилтрансфераза 356
 Холинэстеразы 91, 396
 Хондрозин [3-О-(β-*D*-Глюкопирануроно-
 зил)-2-амино-2-дезоксид-*D*-галакто-
 пираноза] 58, 79, 88
 Хондротин 90
 Хондротинсульфат В (β-Гепарин, Дер-
 матансульфат) 89
 Хондротинсульфаты 79, 84 сл., 88 сл.
 Хондромуклопротеин 84
 Хромопротеиды 100 сл.

Целлобиоза [4-О-(β-*D*-Глюкопиранозил)-
 D-глюкопираноза] 48, 49, 58
 Целлюлоза(ы) 62, 63
 Церазин 342
 Церамид 327, 366
 Церамидаза 366
 Церамидолитогексозиды 343
 Церамидфосфорилглицерин 339
 Церамидфосфорилглицеринфосфат 339
 Церамидфосфорилхолинтрансфераза 366
 Церамидфосфорилхолины см. Сфинго-
 миелины
 Церамидфосфорилэтаноламин 366
 Церамиды 324
 Церебрин (Фитосфингозин) 325. *См.*
 также 4-Оксисфинганин
 Цереброзидазы 367
 Цереброзиды 198, 342, 345, 367
 Цереброновая (2-окситетракозановая)
 кислота 194, 342
 Церулоплазмин 91
 Цианкобаламин см. Витамин В₁₂
 Цианопсин 181
 Цикл
 гликозилатный 401
 Кребса см. Кребса цикл
 лимонной кислоты см. Кребса цикл
 пентозный [Гексозомонофосфатный
 (пентозофосфатный, фосфоглюко-
 натный) путь] 68, 426
 трикарбоновых кислот см. Кребса
 цикл
 Циклитолы 301

DL-1,2-О-Циклогексильдигидромиоинозит 311
 13-(Циклопентен-2-ил)-тридекановая
 (хаульмугровая) кислота 195, 202
 11-(Циклопентен-2-ил)-ундекановая
 (гиднокарповая) кислота 195
 Цитогемин (Гемин *a*) 152
 Цитодейтеропорфирин 102, 152
 Цитопилин Н 343, 368
 Цитоплазма 433
 Цитохромоксидаза 155, 165, 404
 Цитохром-*b*₅-редуктаза 156
 Цитохром(ы) 104, 150 сл., 402
 554 (*Chlorobium*) 151
 группы А 151, 152 сл.
 — В 151, 155 сл.
 — С 151, 158 сл., 164
 — D 151, 165 сл.
 a 152 сл., 404—406
 *a*₃ 404, 405
 b 403, 405, 406
 *b*₂ 155 сл.
 *b*₆ 156 сл., 427
 c 151, 157 сл., 160, 404, 406
 *c*₁ 403, 405
 *c*₂ 164
 cc' 160
 cd 165
 d [Цитохром *a*₂, Цитохром *d*₁ (*a*₄)]
 165
 f 427
 RHP 164
 Цитрат(изоцитрат)—гидро-лиаза см.
 Аконитаза
 Цитрат—оксалоацетат-лиаза (Цитрат-
 синтаза) 400
 Щавелевоуксусная кислота 399, 401, 422,
 434 сл.
 Эйкозодиеновые кислоты 193
n-Эйкозановая (арахиновая) кислота
 191, 202
 Эйкозатентаен-5,8,11,14,17-овая кислота
 193
 Эйкозасфинганин 333, 339
 4-Эйкозасфингенин 333, 339
 Эйкозатетраен-5,8,11,14-овая (арахиноно-
 вая) кислота 181, 193, 208—211,
 350
 Эйкозатетраен-8,11,14,17-овая кислота
 193
 Эйкозатриеновые кислоты 193
 Экзергонический процесс 419, 420, 421,
 424
 Экситоны 427
 Элаидиновая кислота 201
 Элаидиновая кислота 201
 Электрогенный насос 431
 Элеостеариновая кислота 201
 Эмбдена—Мейергофа—Ларнаса распад
 68, 70 сл.
 Эндергонический процесс 419, 420, 422,
 424
 Энергетический обмен клетки 407
 Энергетическое сопряжение, гипотезы 409

Энергия
использование биологическими системами 429
клетки, формы 409
Эпинозит 300
Эпимеры 14
12,13-*цис*-Эпоксистероидная кислота 194
2,3-*транс*-Эпоксистероидная кислота 336
Эремуран 64
D-Эритрит 15 сл.
D-Эритроза 11
D-Эритрозо-4-фосфат 70
Эритропозитин 91, 92
Эритроциты 90, 93 сл., 146
Эрлиха реакция 46
Эруковая (докозен-13-овая) кислота 193, 214
Этаноламин 356, 366
Этаноламинфосфат-цитидилтрансфераза 356

Этаноламинфосфокиназа 356
2-Этил-4-ацетилдейтеропорфирин IX, диметиловый эфир 107
4,6-О-Этилиден-1,2-О-изопропилиден- α -D-галактоза 345
Этиопорфирин 101, 106, 111, 113, 126
Этиопорфирин III 102, 108, 118
Этоксигильная защита 238
Эффект
Бора 135, 137 сл.
Оверхаузера 34
соучастия 51
 Δ^2 19
Эффекторы 434, 436

Яблочная кислота 399, 401, 403
Янтарная кислота 143, 399 сл., 403
Яппа—Клингемана реакция 334, 335

ХИМИЯ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ПРИРОДНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

УГЛЕВОД-БЕЛКОВЫЕ
КОМПЛЕКСЫ,
ХРОМОПРОТЕИДЫ,
ЛИПИДЫ,
ЛИПОПРОТЕИДЫ,
ОБМЕН ВЕЩЕСТВ

Под редакцией Н. А. Преображенского
и Р. П. Евстигнеевой

*Рима Порфирьевна Евстигнеева,
Галина Андреевна Серебренникова,
Елена Николаевна Звонкова,
Елена Иосифовна Филиппович,
Тамара Константиновна Митрофанова,
Галина Ивановна Мягкова,
Юлий Евгеньевич Скляр*

Редактор *Пастушенко М. Н.*
Технический редактор *Вознесенская Р. М.*
Художник *Александров А. С.*
Корректоры *Иваницкая О. В., Хрипунова М. С.*

Т 20762. Сдано в наб. 1/VII 1975 г. Подп. в печ. 22/XII 1975 г.
Формат бумаги 70 × 100^{1/16}. Бумага тип. № 2. Усл. печ. л. 37,05.
Уч.-изд. л. 39,35. Тираж 5000 экз. Заказ 2394. Изд. № 899. Цена 1 р. 71 к.

Издательство «Химия», 107076, Москва, ул. Стромынка, д. 13, корп. 2.

Типография № 11 Союзполиграфпрома при Государственном комитете
Совета Министров СССР по делам издательств, полиграфии и книжной
торговли. Москва, 113105. Нагатинская ул., д. 1.

ЗАМЕЧЕННЫЕ ОПЕЧАТКИ

Стр.	Строка	Напечатано	Должно быть
333	Нижняя формула, справа	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}-\text{C}\equiv\text{C}-\overset{\text{OH}}{\underset{\text{NO}_2}{\text{CH}}}-\text{CHCH}_2\text{OH}$	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}-\text{C}\equiv\text{C}-\overset{\text{NO}_2}{\underset{\text{OH}}{\text{CH}}}-\text{CHCH}_2\text{OH}$
334	Верхние формулы, справа	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}-\text{C}\equiv\text{C}-\overset{\text{OH}}{\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}}-\text{CHCH}_2\text{OH}$ $\xrightarrow[\text{[H]}]{\text{LiAlH}_4}$ $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}-\overset{\text{H}}{\text{C}}=\overset{\text{H}}{\text{C}}-\overset{\text{OH}}{\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}}-\text{CHCH}_2\text{OH}$ $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}-\overset{\text{H}}{\underset{\text{H}}{\text{C}}}=\overset{\text{H}}{\underset{\text{H}}{\text{C}}}-\overset{\text{OH}}{\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}}-\text{CHCH}_2\text{OH} \leftarrow$	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}-\text{C}\equiv\text{C}-\overset{\text{NH}_2}{\underset{\text{OH}}{\text{CH}}}-\text{CHCH}_2\text{OH}$ $\xrightarrow[\text{[H]}]{\text{LiAlH}_4}$ $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}-\overset{\text{H}}{\text{C}}=\overset{\text{H}}{\text{C}}-\overset{\text{OH}}{\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}}-\text{CHCH}_2\text{OH}$ $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}-\overset{\text{H}}{\underset{\text{H}}{\text{C}}}=\overset{\text{H}}{\underset{\text{H}}{\text{C}}}-\overset{\text{OH}}{\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}}-\text{CHCH}_2\text{OH} \leftarrow$
396	17 снизу		$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}-\overset{\text{H}}{\text{C}}=\overset{\text{H}}{\text{C}}-\overset{\text{OH}}{\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}}-\text{CHCH}_2\text{OH}$ $\xrightarrow[\text{[H]}]{\text{LiAlH}_4}$ $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}-\overset{\text{H}}{\text{C}}=\overset{\text{H}}{\text{C}}-\overset{\text{OH}}{\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}}-\text{CHCH}_2\text{OH}$ $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}-\overset{\text{H}}{\underset{\text{H}}{\text{C}}}=\overset{\text{H}}{\underset{\text{H}}{\text{C}}}-\overset{\text{OH}}{\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}}-\text{CHCH}_2\text{OH} \leftarrow$
432	17 сверху		$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}-\overset{\text{H}}{\text{C}}=\overset{\text{H}}{\text{C}}-\overset{\text{OH}}{\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}}-\text{CHCH}_2\text{OH}$ $\xrightarrow[\text{[H]}]{\text{LiAlH}_4}$ $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}-\overset{\text{H}}{\text{C}}=\overset{\text{H}}{\text{C}}-\overset{\text{OH}}{\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}}-\text{CHCH}_2\text{OH}$ $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}-\overset{\text{H}}{\underset{\text{H}}{\text{C}}}=\overset{\text{H}}{\underset{\text{H}}{\text{C}}}-\overset{\text{OH}}{\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}}-\text{CHCH}_2\text{OH} \leftarrow$